

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## Přírodovědecká fakulta

BIOLOGIE

Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Petra Bendová

### **Stanovování metylací v promotorových oblastech genů řídících metabolismus 5 – fluorouracilu**

Determination of methylation in the promoter regions of genes  
that control metabolism of 5 - fluorouracil

*Diplomová práce*

Školitel: MUDr. Pavel Vodička, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 14.8.2015

.....

Petra Bendová

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu školiteli MUDr. Pavlu Vodičkovi CSc. za cenné rady, připomínky, ochotu a trpělivost, s kterou mi pomáhal při řešení mé diplomové práce. Dále mé velké díky patří MUDr. Ludmile Vodičkové, CSc. a celému kolektivu Oddělení biologie nádorů AV ČR za vytvoření příjemného prostředí, vstřícné přijetí do kolektivu a veškeré odborné rady a konzultace.

Při této příležitosti vyjadřuji poděkování Doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. ze SZÚ v Praze za poskytnutí příležitosti spolupracovat na uvedeném projektu.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala Doc. MUDr. Ludmile Lipské, CSc. a MUDr. Miroslavu Levému, PhD. z Thomayerovy nemocnice v Praze, MUDr. Michaele Schneiderové z VFN a 1. Lékařské fakulty UK v Praze a MUDr. Václavu Liškovi, PhD. z FN UK Praha se sídlem v Plzni za poskytnutí biologického materiálu a zásadních klinicko-patologických údajů.

## Abstrakt

Cytostatikum 5-fluorouracil (5-FU) se používá při léčbě řady nádorových onemocnění, zejména nádoru tlustého střeva a konečníku, pankreatu, prsu nebo vaječníků. 5-FU se v lidském organismu přeměňuje na aktivní metabolity, které poškozují cílové buňky a následně způsobují jejich apoptózu.

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovení hladin metylací v promotorových oblastech 14 kandidátních genů podílejících se na metabolismu 5-FU: *TK1*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *UCK2*, *UCK1*, *UMPS*, *TYMP*, *UPP1*, *UPP2*, *SLC29A1*, *UPB1*, *DPYS* a *DPYD*. Předpokládáme, že metylace v promotorových oblastech reguluje mRNA transkripci uvedených genů. Byla provedena analýza uvedených parametrů u 128 pacientů, kterým byla odebrána nádorová tkáň společně s tkání nenádorovou. Práce zahrnuje izolaci DNA z nádorové i nenádorové tkáně, bisulfitickou přeměnu nemetylovaných cytosínů na uracily, metylačně specifickou analýzu křivek tání s vysokým rozlišením pro vlastní analýzu metylací a gelovou elektroforézu pro separaci PCR produktů.

U většiny studovaných genů, tj. *TK1*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *UCK2*, *UCK1*, *UMPS*, *TYMP*, *UPP1*, *SLC29A1* a *DPYD* jsme nedetkovali žádnou metylaci promotorových oblastí. U studovaných genů *DPYS*, *UPB1* a *UPP2* jsme pak našli metylace v promotorových oblastech různých hodnot. Statisticky významný rozdíl mezi tumorem a přilehlou nenádorovou tkání ( $P < 0,05$ ) byl však pozorován pouze u genů *UPB1* a *DPYS* v testovacím souboru a u genu *DPYS* ve validačním souboru I. Ve spolupráci se SZÚ se porovnávaly hladiny exprese vybraných genů, u kterých byla úroveň metylace vyšší než 0%, a bylo potvrzeno, že hypermethylace promotorových oblastí v genech zahrnutých do biotransformace 5-FU neměla vliv na úroveň jejich exprese.

Vedlejším cílem této studie bylo rámcové porovnávání stanovovaných parametrů uvedených genů ve vztahu k terapii 5-FU. Doba přežívání pacientů se významně nelišila mezi skupinami s hypometalci a hypermethylací promotorových částí genů *DPYS*, *UPB1* a *UPP2*. Bylo však potvrzeno, že skupiny pacientů léčených 5-FU s hypometylovanými nebo hypermetylovanými promotory vykazují lepší prognózu oproti pacientům léčených jinými cytostatiky.

Klíčová slova: 5-fluorouracil, epigenetické mechanismy, DNA metylace, bisulfitická konverze, analýza křivek tání s vysokým rozlišením.

## Abstract

Several malignant diseases, such as colorectal, pancreatic, breast or ovarian cancers, are primarily treated with cytostatics 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU undergoes biotransformation in human body and arising metabolites induce the damage and subsequent apoptosis in the target cells.

The main aim of this diploma Thesis was the determination of methylation in promoter regions of 14 candidate genes participating on 5-FU biotransformation: *TK1*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *UCK2*, *UCK1*, *UMPS*, *TYMP*, *UPP1*, *UPP 2*, *SLC29A1*, *UPB1*, *DPYS* and *DPYD*. We hypothesize that the methylation in promoter regions regulates mRNA transcription of the above candidate genes. We have conducted appropriate analyses in 128 colorectal cancer patients, for whom both tumor and nonmalignant adjacent tissues were available. Sample processing and analysis involved DNA isolation, bisulfite conversion of unmethylated cytosines to corresponding uracils, methylation-specific analysis of melting curves with high resolution for the proper methylation analysis and gel electrophoresis to separate PCR products.

For the majority of the studied genes (*TK1*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *UCK2*, *UCK1*, *UMPS*, *TYMP*, *UPP1*, *SLC29A1* and *DPYD*) we did not detect any aberrant methylation in promoter regions. In genes *DPYS*, *UPB1* and *UPP2* we recorded various degree of promoter methylation. Statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) in methylation by comparing tumor tissue and adjacent mucosa were observed in testing set for genes *UPB1* and *DPYS* and for *DPYS* in validation set I.

In collaboration with Natl. Inst. Public Health we were comparing expressions of genes with elevated levels of promoter methylation. However, hypermethylation of promoter regions in genes involved in 5-FU biotransformation did not affect mRNA transcription.

We have also analysed studied parameters as prognostic markers in relation to the 5-FU therapy. In general, overall survival was not different in relation to hypo- or hypermethylation of *DPYS*, *UPB1* and *UPP2* promoter regions. However, patients treated with 5-FU with simultaneous hypo- or hypermethylation in *DPYS*, *UPB1* and *UPP2* exhibit better prognosis than those treated with other cytostatics.

Key words: 5-Fluorouracil, mechanisms of epigenetics, DNA methylation, bisulfite conversion, methylation specific high resolution melting.

# Obsah

<b>Obsah</b>	5
<b>Seznam zkratk</b>	7
<b>1 Úvod</b>	9
<b>2 Teoretická část</b>	11
2.1 Charakteristika 5-fluorouracilu	11
2.2 5-fluorouracil a jeho metabolismus v buňce	12
2.2.1 Dráha anabolismu 5-fluorouracilu	12
2.2.2 Dráha katabolismu 5-fluorouracilu	13
2.2.3 Mechanismus inhibice tymidilát syntézy 5-fluorouracilem	14
2.3 Sledované kandidátní geny	15
2.4 Nádorové léčení 5-fluorouracilem	20
2.4.1 Nádor tlustého střeva a konečníku	20
2.4.2 Nádor slinivky břišní	21
2.4.3 Nádor prsu	22
2.4.4 Nádor vaječníků	22
2.5 Epigenetické mechanismy regulace transkripce genů	24
2.5.1 Modifikace histonů	25
2.5.1.1 Acetylace histonu H3 a H4	25
2.5.2 Metylace DNA	26
2.5.3 Někódující RNA	26
2.6 Principy použitých metod	28
2.6.1 Bisulfitická konverze	28
2.6.2 Metylačně specifická HRM	30
2.6.3 Elektroforéza	32
<b>3 Cíle diplomové práce</b>	34
<b>4 Materiál a metody</b>	35
4.1 Sběr biologického materiálu	35
4.2 Spotřební materiál, reagentie, přístroje	35
4.3 Izolace DNA z tkání	36
4.4 Měření koncentrace izolované DNA	36
4.5 Bisulfitická konverze	37
4.6 Studované geny a sekvence primerů	38

4.7 Metylačně specifická HRM .....	40
4.8 Gelová elektroforéza .....	41
4.9 Statistické hodnocení .....	42
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>43</b>
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>61</b>
<b>8. Použitá literatura .....</b>	<b>62</b>



## SEZNAM ZKRATEK

5-FU – 5-fluorouracil

5mC – 5'-methylcytosin

BC – bislufitická konverze

BER – báзовá excizní oprava (base excision repair)

CRC – kolorektální karcinom (colorectal cancer)

DHFU – dihydrofluorouracil

DNMT – DNA metyltransferázi

DNMT – DNA-methyltransferáza

DPD – dihydropyrimidin dehydrogenáza

dTMP – deoxytymidin monofosfát

dUMP – deoxyuridin monofosfát

dUTP – deoxyuridin trifosfát

FdUDP - fluorodeoxyuridin difosfát

FdUMP - fluorodeoxyuridin monofosfát

FdUTP – fluorodeoxyuridin trifosfát

FUDP – fluorouridin difosfát

FUH2 – dihydrofluorouracil

FUMP - fluorouridin monofosfát

FUPA -  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -ureidopropionát

FUR – fluorouridin

FUTP- fluorouridin trifosfát

HADC – histon-deacetylázy

HAT – histon-acetyltransferázy

CH<sub>2</sub>THF – 5,10-metylen tetrahydrofolat

lnc RNA – dlouhé nekódující RNA

miRNA – microRNA

MMR – mismatch oprava (mismatch repair)

MSI – mikrosatelitní nestabilita

ncRNA – nekódující (noncoding) RNA

OPRT – ororát fosforibosyl transferáza

PCR – polymerázová řetězová reakce

PRPP – fosforibosyl pyrofosfát  
RISC – RNA indukovaný umlčovací komplex  
RR – ribonukleotid reduktáza  
SAM – S-adenosyl-L-metionin  
siRNA – krátké interferující RNA  
SNP – jednonukleotidové polymorfismy  
Ta – teplota nasednutí primerů  
TK – tymidin kináza  
TMP – tymidin monofosfát  
TP – tymidin fosforyláza  
TS – tymidilát syntéza  
UDP – uracil-DNA glykosyláza  
UK – uridin kináza  
UP – uridin fosforyláza  
UTP – uridin trifosfát  
UTR – nepřekládaná oblast

Vzhledem k běžnému užívání zkratk názvů genů nejsou v tomto seznamu jejich zkratky uvedeny.

# 1 Úvod

Cytostatická léčba 5-fluorouracilem (5-FU) zlepšuje přežívání u celé řady pacientů s různými typy karcinomů. Nejčastěji se tento lék využívá u pacientů s nádory tlustého střeva a konečníku (CRC), ale 5-FU bývá aplikován i při léčbě celé řady dalších nádorů (Labianca, Marsoni et al. 1995). V současné klinické praxi se 5-FU využívá k léčbě adjuvantní i paliativní a to především u nádorů tlustého střeva a konečníku, prsu, slinivky břišní, žaludku, vaječníků, děložního čípku, prostaty a dalších. Ačkoliv dobu přežití pacientů lze zvýšit kombinovanou léčbou 5-FU s irinotekanem či oxaliplatinou, tyto modifikace zvyšují toxicitu léčby a celková úroveň odpovědi na terapii 5-FU u pokročilých forem nádorů CRC je jen 10-15% (Boige, Mendiboure et al. 2010) (de Gramont, Figer et al. 2000) (Douillard, Cunningham et al. 2000). Pro uplatnění cytotoxického a protinádorového účinku 5-FU je nezbytná jeho intracelulární anaboličká aktivace (Malet-Martino and Martino 2002). Aktivní metabolity vzniklé touto anaboličskou cestou způsobují poškození buňky a protinádorový účinek 5-FU spočívá ve dvou hlavních účincích. Aktivní metabolit fluorodeoxyuridin monofosfát (FdUMP) brání tvorbě nukleotidu tymidin monofosfátu (TMP) vazbou na enzym tymidilát syntázu (TS) a brání tak v syntéze DNA. Dalšími aktivními metabolity jsou fluorouridin trifosfát (FUTP), který se do RNA začleňuje místo uracilu, a fluorodeoxyuridin trifosfát (FdUTP), začleňující se do DNA místo thyminu. Neopomenutelným systémem v účinnosti léčby 5-FU je rovněž básová excizní oprava (BER) a mismatch reparace (MMR). Po inkorporaci FdUTP do DNA, může být tento aktivní metabolit odstraněn uracil-DNA-glykosylázou za vzniku jednořetězcových zlomů v DNA, ale vzhledem k nedostatku deoxytymidin monofosfátu (dTMP) nemůže dojít k opravě těchto zlomů. Za biodegradaci 5-FU na neaktivní metabolit dihydrofluorouracil (DHFU) je zodpovědný enzym dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), jehož nedostatek vede k vysoké toxicitě následkem akumulace 5-FU v organismu (Malet-Martino and Martino 2002), (Heggie, Sommadossi et al. 1987, Saif, Choma et al. 2009). Opomenout nelze ani fakt, že odpověď na terapii, celkové přežívání a s léčbou spojená toxicita jsou zatíženy intra- i interindividuální variabilitou, a to jak v oblasti transportu, metabolismu 5-FU, metabolismu folátů, tak v účinnosti odstraňování halogenuracilu z molekuly DNA

(Ulrich, Robien et al. 2003) (Pardini, Kumar et al. , Pardini, Kumar et al. 2011)  
(Wyatt and Wilson 2009)

Právě porozumění biotransformaci 5-FU vedlo k následné identifikaci genů podílejících se na jeho metabolismu. A vzhledem k tomu, že nádory léčené 5-FU patří mezi nejčastěji se vyskytující malignity, jak s vysokou incidencí, tak bohužel i mortalitou a vyznačující se širokou variabilitou klinické odpovědi, je nezbytné studovat molekulárně-biologický fenotyp těchto nádorových onemocnění. Velký důraz je kladen na markery, které by mohly být použity pro průběžné sledování a mohly přesněji určit prognózu pacienta nebo dokonce predikovat odpověď na léčbu. Dosavadní znalosti genetických změn vedoucích především ke změnám v expresi jednotlivých genů nejsou však pro pochopení nádorové transformace buňky dostačující. Proto je zapotřebí velkou pozornost věnovat odhalování faktorů ležících i mimo samotnou sekvenci nukleotidů. Mezi takové faktory nepochybně patří epigenetické mechanismy, především metylace DNA v promotorových oblastech genů, která je spolu s dalšími mechanismy zodpovědná za umlčování transkripce a následně exprese příslušných proteinů.

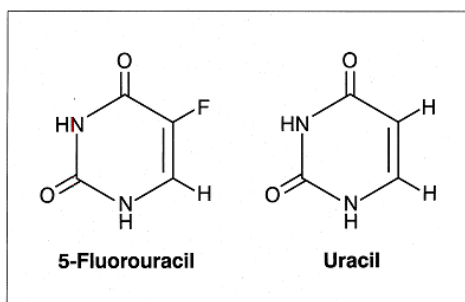
## 2 Teoretická část

### 2.1 Charakteristika 5-fluorouracilu

Ačkoliv od syntézy 5-FU Heidelbergem a od prvního klinického použití uběhlo více než 40 let (Heidelberger, Chaudhuri et al. 1957), tato látka patří mezi nejčastěji ordinovaná cytostatika v léčbě řady nádorů, a to především CRC, karcinomu žaludku, jater, pankreatu, prsu či vaječníků. 5-FU se ve vztahu k chirurgické léčbě využívá jako součást adjuvantní, paliativní i neoadjuvantní chemoterapie. Může se uplatňovat v monoterapii, v kombinované terapii s podpůrnými či pomocnými léčivy nebo v kombinaci se zářením (Klocová K. 2003), (Martínková J. 2011) (Svoboda M. 2004). U pokročilých stádií nádorů, zejména CRC, bývá celková odpověď na léčbu 5-FU pouhých 10-15%. V kombinaci s dalšími léky, např. společně s oxaliplatinou či irinotekanem, však odpověď na léčbu stoupá až na 40-50% (Johnston and Kaye 2001) (Douillard, Cunningham et al. 2000) (Giacchetti, Perpoint et al. 2000).

FU je analogem uracilu s atomem fluoru substituujícím vodík na pozici C-5 a svou strukturou se velmi podobá pyrimidinovým molekulám. Díky této strukturální podobnosti může být začleňován do RNA nebo DNA a způsobovat tak poškození buňky (Wyatt and Wilson 2009). Do buněk vstupuje stejným transportním systémem jako uracil. Jedná se o mechanismus usnadněného transportu po koncentračním gradientu s přispěním ekvilibrativního nukleosidového transportéru ENT (Perumal, Pillai et al. 2006), (Baldwin, Mackey et al. 1999).

Obrázek 1 : Struktura uracilu a 5-FU s fluorem na C-5 pozici uracilu. Převzato z (Blanke, Teng et al 1999)



## 2.2 5-Metabolismus 5-FU v buňce

Po transportu do buňky, je 5-FU metabolizován dvěma konkurenčními drahami. Anabolickou cestou vznikají tři hlavní aktivní metabolity, FUTP, FdUTP, FdUMP, které jsou následně zodpovědné za poškození cílové buňky. Naopak katabolická cesta vede k inaktivaci 5-FU a jeho eliminaci z organismu (Malet-Martino and Martino 2002) (Longley, Harkin et al. 2003).

### 2.2.1 Dráha anabolismu 5-FU

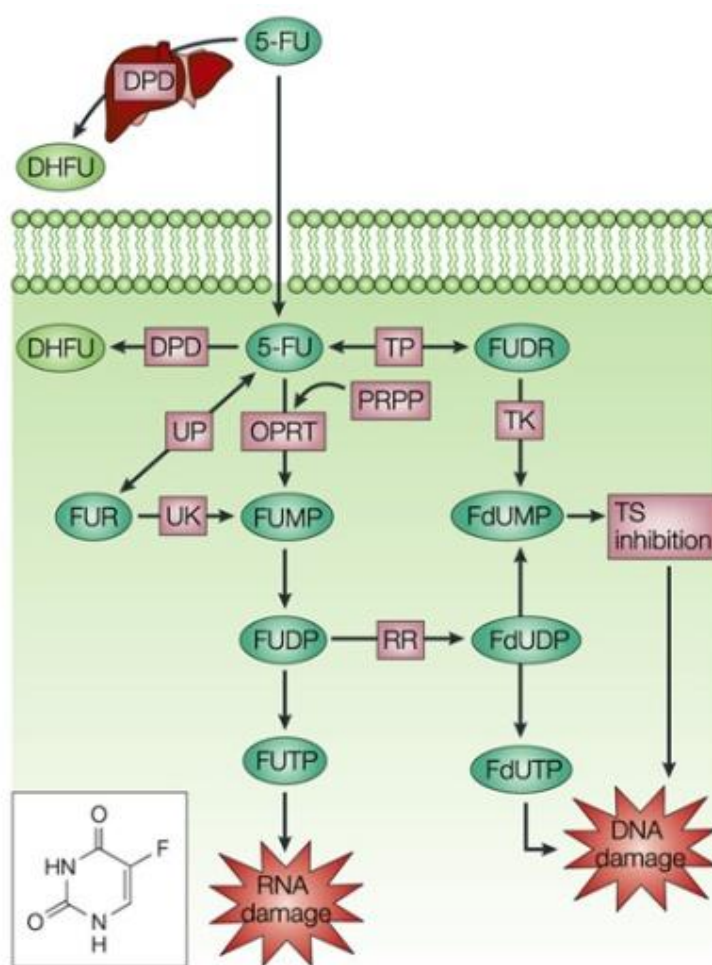
Hlavním mechanismem aktivace 5-FU je přeměna na fluorouridin monofosfát (FUMP) a to buď přímo pomocí orotát fosforibosyltransferázy (OPRT) s fosforibosyl pyrofosfátem (PRPP) jako kofaktorem nebo nepřímo dráhou přes fluorouridin (FUR) za postupné účasti příslušných kináz uridin fosforylázy (UP) a uridin kinázy (UK). FUMP je následně fosforylován na fluorouridin difosfát (FUDP), který může být buď dále fosforylován na aktivní metabolit (FUTP) nebo přeměňován na fluorodeoxyuridin difosfát (FdUDP) pomocí ribonukleotid reduktázy (RR). FdUDP je následně fosforylován nebo defosforylován na aktivní metabolity FdUTP a FdUMP. Alternativní dráha přeměny 5-FU na aktivní metabolity zahrnuje tymidin fosforylázu (TP), která katalyzuje přeměnu 5-FU na fluorodeoxyuridin (FUDR), který je následně fosforylován tymidin kinázou (TK) na FdUMP (Malet-Martino and Martino 2002) (Longley, Harkin et al. 2003).

FUTP je následně inkorporován RNA polymerázou do RNA, namísto uridin-trifosfátu (UTP). FdUTP se chová jako substrát pro DNA polymerázu a je následně inkorporován do DNA. FdUMP se váže na enzym TS, vytváří s ní stabilní ternární komplex, a blokuje tak tvorbu jednoho z deoxyribonukleotidů pro syntézu DNA (Klocová K. 2003), (Malet-Martino and Martino 2002), (Longley, Harkin et al. 2003) ,(Shirasaka 2009).

## 2.2.2 Dráha katabolismu 5-FU

Limitujícím enzymem v katabolismu 5-FU je dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), která redukuje 5-FU na dihydrofluorouracil (FUH<sub>2</sub>). Následně je FUH<sub>2</sub> štěpen za vzniku  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -ureidopropionátu (FUPA) a v posledním kroku za katalýzy  $\beta$ -alanin syntázy vzniká hlavní katabolit 5-FU  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanin, za uvolnění amoniaku a CO<sub>2</sub>.  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanin je hlavní katabolit 5-FU a je vylučován močí. Více než 80% podávaného 5-FU je primárně katabolizováno v játrech, kde je DPD hojně exprimována, a jen malá část podávaného 5-FU je přeměněno na aktivní metabolity (Malet-Martino and Martino 2002) (Longley, Harkin et al. 2003) (Klocová K. 2003), (Shirasaka 2009).

Obrázek 2 : Zjednodušené schéma drah aktivace 5-FU. Převzato z (Daniel B. Longley *et al.* 2003).

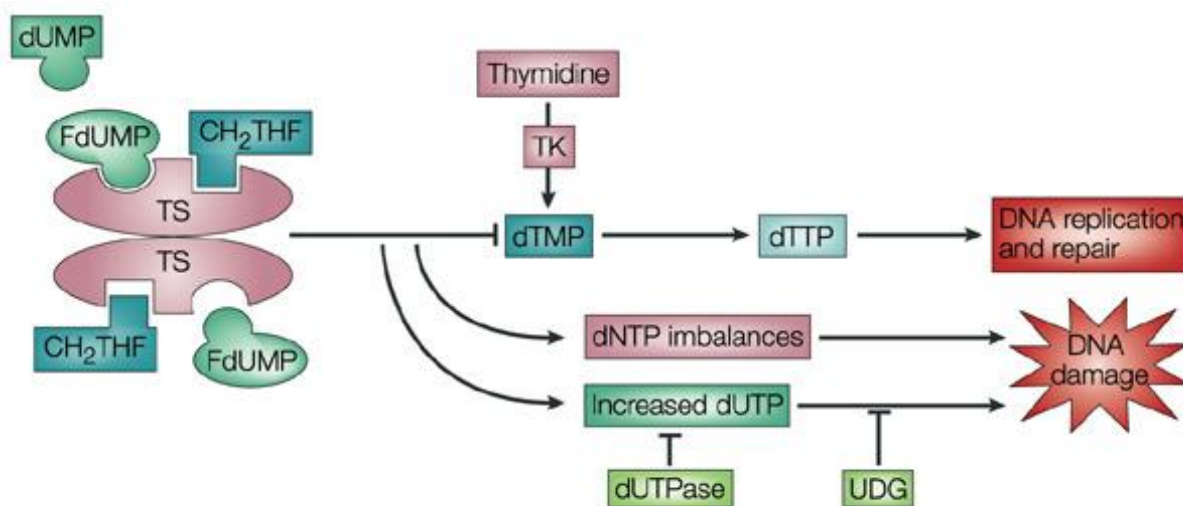


Na obrázku jsou znázorněny 3 hlavní dráhy přeměny 5-FU na aktivní metabolity FUTP, FdUTP, FdUMP a dráha katabolismu 5-FU na DHFU.

### 2.2.3 Mechanismus inhibice tymidylát syntázy 5-FU

Tymidylát syntéza (TS) je klíčový enzym v *de novo* syntéze pyrimidinových nukleotidů a katalyzuje přeměnu deoxyuridin monofosfátu (dUMP) na dTMP s 5, 10-metylen tetrahydrofolátem ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) jako donorem metylové skupiny. Aktivní metabolit 5-FU FdUMP se váže do nukleotidového vazebného místa TS a tvoří tak společně s TS a  $\text{CH}_2\text{THF}$  stabilní ternární komplex, čímž je blokována možná vazba dUMP do vazebného místa TS a je inhibována syntéza dTMP, který je nezbytný pro DNA replikaci a DNA opravu (Wilson, Danenberg et al. 2014) (Wyatt and Wilson 2009). Výsledná nerovnováha deoxynukleotidů a nadměrná akumulace deoxyuridin trifosfátů (dUTP) způsobuje DNA poškození. Rozsah poškození DNA způsobený vysokou hladinou dUTP je závislý na hladině pyrofosfatázy dUTPázy a uracil-DNA glykosylázy (UDG). dTMP může být nahrazen přeměnou z tymidinu za účasti tymidin kinázy (Longley, Harkin et al. 2003) (Svoboda M. 2004).

Obrázek 3 : Zjednodušené schéma dráhy inhibice tymidylát syntázy 5-FU. Převzato z (Daniel B. Longley et al. 2003)



Na obrázku je znázorněn mechanismus tvorby ternárního komplexu FdUMP,  $\text{CH}_2\text{THF}$  s TS, blokujícího tvorbu dTMP a následné DNA poškození. Znázorněna je i alternativní dráha tvorby dTMP z tymidinu přes TK.



## 2.3 Sledované kandidátní geny

I když osud 5-FU je studován v našem Oddělení v celé komplexitě, zahrnující celulární transport a mechanismy DNA opravy, pro diplomovou práci bylo zvoleno 14 kandidátních genů podílejících se na metabolismu 5-FU. Je třeba poznamenat, že námi studovaná oblast dosud nebyla zmapována.

### Gen *DPYD*

*DPYD* gen je v lidských buňkách lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1 (1p22) a kóduje enzym dihydropyrimidin dehydrogenázu. Tento enzym je zodpovědný za první krok v degradaci pyrimidinových nukleotidů thyminu a uracilu. Uracil je tímto enzymem přeměněn na 5,6-dihydrouracil a thymin pak na 5,6-dihydrothymin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1806>). Mutace v tomto genu vede k deficienci *DPYD*, což má za následek hromadění pyrimidinů v krvi, moči, mozkomíšním moku a může docházet až k neurologickým poruchám. Deficience enzymu *DPYD* má za následek i riziko vysoké toxicity u pacientů léčených 5-FU, vzhledem k jeho akumulaci v organismu (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/DPYD>).

### Gen *DPYS*

*DPYS* gen je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 8 (8q22) a kóduje enzym dihydropyrimidinázu. Tento enzym je zahrnut v druhém kroku postupné degradace pyrimidinů. Rozrušuje kruhovou strukturu 5,6-dihydrouracilu a 5,6-dihydrothyminu. Dihydropyrimidináza je nejvíce exprimována v ledvinách a játrech. Defekt v *DPYS* genu má za následek dihydropyrimidinurii. Dihydropyrimidináza také napomáhá degradaci fluoropyrimidinových cytostatik, především 5-FU (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/DPYS>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1807>).

### Gen *UPB1*

*UPB1* gen je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 22 (22q11.2) a kóduje enzym beta-ureidopropionázu, který je zahrnut v posledním kroku v dráze degradace pyrimidinů, tj. přeměňuje produkty vzniklé za účasti enzymu

dihydropyrimidinázy na kyselinu  $\beta$ -aminoisomáselnou a  $\beta$ -alanin. Deficience tohoto enzymu způsobuje s N-carbamyl-beta-amino acidurii a může vést až k neurologickým poruchám

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51733>) (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/UPB1>).

### **Gen *TYMP***

*TYMP* gen je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 22 (22q13.33) a kóduje enzym tymidin fosforylázu, který přeměňuje tymidin na dvě menší molekuly, tymin a 2-deoxyribózu-1-fosfát. Reguluje tak hladinu nukleosidů v buňce (Akiyama, Furukawa et al. 2004) (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TYMP>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1890>).

### **Gen *UPP2***

*UPP2* gen je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 2 (2q24.1) a kóduje enzym uridin-fosforylázu 2, který patří do rodiny glykosyltransferáz a dokáže metabolizovat reverzní fosforylaci uridinu na uracil v této chemické reakci: Uridin + fosfát = uracil + alfa-D-ribóza 1-fosfát. Substráty jsou následně využívány jako zdroj uhlíku a energie, rovněž poskytují pyrimidinové báze v syntéze nukleotidů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/151531>).

### **Gen *UPP1***

*UPP1* gen je v lidských buňkách lokalizován na krátkém raménku chromozomu 7 (7p12.3) a kóduje enzym uridin-fosforylázu 1. Tento enzym se podobně jako uridin fosforyláza 2 účastní reverzní fosforylace uridinu a tymidinu na volné báze a ribózu-1-fosfát (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22271>).

### **Gen *PPAT***

*PPAT* gen je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 4 (4q12) a kóduje enzym fosforibosyl pyrofosfát amidotransferázu. Tento enzym

se účastní prvního kroku v *de novo* syntéze purínů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5471>).

### **Gen *UMPS***

Gen *UMPS* je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 3 (3q13 ) a kóduje enzym uridin 5'-monofosfát syntetázu. Tento bifunkční enzym je složený ze dvou domén a účastní se posledních dvou kroků v dráze *de novo* syntézy pirimidinů. V první fázi enzym OPRTáza (orotát fofsoribosyltransferáza) přeměňuje kyselinu orotovou na OMP (orotidin 5'-monofosfát). V druhé fázi je OMP dekarboxylován za účasti enzymu ODCázy (orotidin-5'-fosfát dekarboxylázy) na UMP (uridin monofosfát). Defekty v tomto genu mají za následek hereditární acidúrii (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/UMPS>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7372>).

### **Gen *RRM1***

*RRM1* gen je v lidských buňkách lokalizován na krátkém raménku 11 (11p15.5) a kóduje velkou podjednotku ribonukleosid-difosfát reduktázy, enzymu, který tvoří deoxyribonukleotidy před DNA syntézou v S fázi buněčného cyklu. Tento gen je lokalizován v oblasti tumor-supresorového genu *WT1* a změny v této oblasti mohou být spojovány s Beckwith-Wiedemannovým syndromem, Wilmsovým tumorem či karcinomem plic, vaječníků a prsu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6240>).

### **Gen *RRM2***

*RRM2* gen je v lidských buňkách lokalizován na krátkém raménku chromozomu 2 (2p25-p24) a kóduje malou podjednotku ribonukleosid-difosfát reduktázy, která katalyzuje přeměnu deoxyribonukleotidů z ribonukleotidů potřebných pro DNA syntézu. Změny v tomto genu jsou spojovány s nádory slinivky břišní (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6241>).

### **Gen *UCK1***

Tento gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 9 (9q34.13) a kóduje enzym uridin-cytidin kinázu 1, patřící do rodiny transferáz, která katalyzuje fosforylaci uridinu a cytidinu za vzniku uridin monofosfátu, resp. cytidin monofosfátu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83549>).

### **Gen *UCK2***

Tento gen je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 1 (1q23) a kóduje uridin-cytidin kinázu 2. Tento enzym se podobně jako enzym UCK1 účastní metabolismu pyrimidinů tím, že katalyzuje fosforylaci uridinu či cytidinu na uridin monofosfát (UMP), resp. cytidin monofosfát (CMP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7371>).

### **Gen *TK1***

Tento gen je v lidských buňkách lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 17 (17q23.2-q25.3) a kóduje enzym tymidin kinázu 1. Tento enzym je klíčový v syntéze DNA a katalyzuje fosforylaci tymidinu na tymidin monofosfát (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7083>).

### **Gen *SLC29A1***

Tento gen je v lidských buňkách lokalizován na krátkém raménku chromozomu 6 (6p21.1) a kóduje transmembránový glykoprotein ekvilibrativního nukleosidového transportéru (ENT) lokalizovaného v plazmatických či mitochondriálních membránách. Tento transportní mechanismus je potřebný pro transport nukleosidů do buněk s nedostatečnou *de novo* syntézou purínů a je též nezbytný pro transport cytotoxických analogů nukleosidů, používaných při léčbě nádorů, například cytostatika 5-FU. ENT je citlivý na inhibici vyvolanou nitrobenzylmerkaptopurinem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2030>).

**Title:** Fluoropyrimidine Activity  
**Availability:** CC BY 2.0 [1, 3, 4, 8, 10...](#)  
**Organism:** Homo sapiens



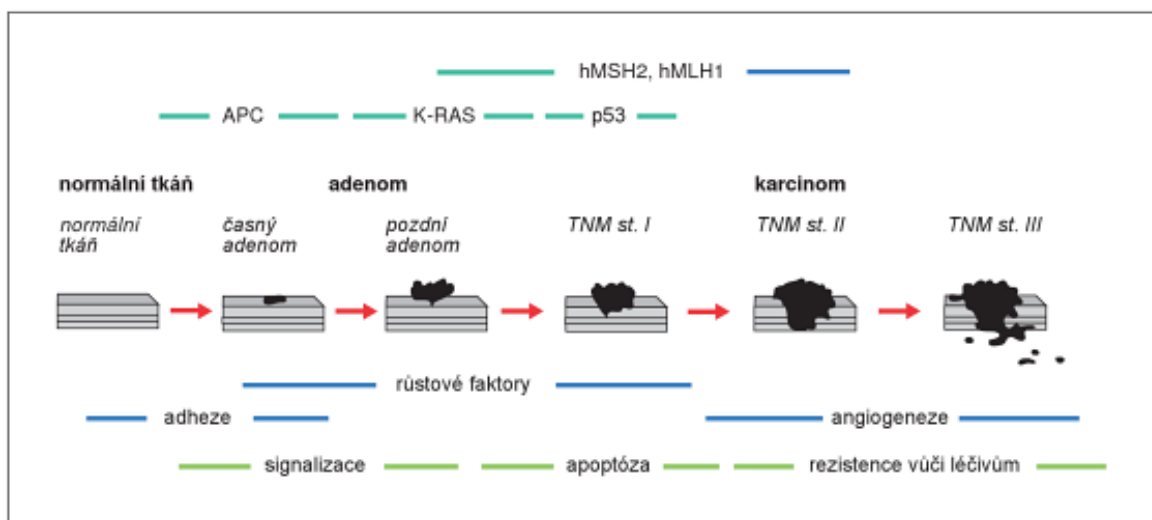
## 2.4 Nádory léčené 5-FU

### 2.4.1 Nádor tlustého střeva a konečníku

Zhoubný nádor CRC představuje v České republice jednu z nejčastějších malignit u mužů i u žen. U žen zaujímá s 12,1% druhé místo mezi všemi malignitami po nádoru prsu. U mužů představuje až 13,7% ze všech malignit a následuje po vedoucích nádorech prostaty a plic (Lipská Grada Publishing 2009). Na předním žebříčku mezi malignitami se ale drží i na celosvětové úrovni.

Komplexní proces rozvoje CRC lze arbitrárně klasifikovat do dvou hlavních drah. První z nich je dráha chromozomální nestability, kterou Fearon a Volgestein popsali jako vícestupňový model kolorektální karcinogeneze (Fearon and Vogelstein 1990). Během tohoto procesu v časně fázi tvorby polypů dochází k mutaci v tumor supresorovém genu pro *APC* (adenomatózní polypóza tračníku). V dalším stádiu adenomatózy hrají roli mutace v onkogenu *KRAS*. Ve fázi malignizace polypů se připojují mutace genu *p53* a delece chromozomu 18q (Fearon and Vogelstein 1990) (Grady and Pritchard 2014). Druhou dráhu představuje tzv. dráha mikrosatelitní nestability (MSI), která je charakterizována snížením či naopak zvýšením počtu tandemových opakování jednoduchých sekvencí DNA – mikrosatelitů. Za MSI především zodpovídají genetické a epigenetické inaktivace genů účastnících se DNA „mismatch“ oprav (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* a *hMSH6*). Následně MSI vede k mutacím genů, které jsou zodpovědné za rozvoj a maligní transformaci nádorů (Takayama, Miyanishi et al. 2006), (Worthley, Whitehall et al. 2007), (Imai and Yamamoto 2008).

Obrázek 5 : Přeměna adenomu v karcinom. Převzato z (Lipská et al. 2009).



Při karcinogeneze CRC se také často setkáváme s globální hypometylací genomu, převážně repetitivních sekvencí DNA, a zároveň s hypermetylací promotorových oblastí důležitých genů, jako jsou např. *hMLH1* či gen *p16* (Jones and Baylin 2002), (Kakar, Burgart et al. 2003)

## 2.4.2 Nádor slinivky břišní

Nádor slinivky břišní patří mezi nejvíce agresivní a devastující onemocnění s velmi krátkou dobou přežívání. V celosvětovém měřítku zaujímá třinácté místo a představuje asi 2% ze všech nádorových onemocnění. Tato malignita postihuje muže i ženy, i když muže o něco častěji než ženy. Z 95% nádor slinivky břišní představuje duktální adenokarcinom vycházející z ductus pancreaticus. Pacienti s tímto typem nádorů se průměrně dožívají pouze 6 měsíců. Jen asi 5 % pacientů přežívají po dobu pěti let (Campa, Rizzato et al. 2013). Na vině často může být nedostatečné rozpoznání specifických symptomů a tím pádem pozdní diagnóza onemocnění s již rozsáhlými metastázami. Na molekulární úrovni nacházíme mutace ve velkém počtu genů. Gen *KRAS2* patří mezi onkogeny a bývá mutován u více jak 95 % nádorů slinivky břišní. *KRAS2* gen je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 12 a kóduje GTP vazebný protein, který je zahrnutý v mnoha buněčných procesech, odpovědných především za proliferaci, buněčné přežívání či remodelaci cytoskeletu. Velmi často se také vyskytují mutace v tumor supresorových genech, např. v genu *CDKN2A*, *TP53* a v genu *SMAD4*.

(Li, Xie et al. 2004) (Ling, Feng et al. 2014) (Moir, Mann et al. 2015) (Smit, Boot et al. 1988) (Bardeesy and DePinho 2002) (Kern 2008) (Hong, Park et al. 2011)

### 2.4.3 Nádor prsu

Karcinom prsu patří mezi nejčastější maligní onemocnění u žen, avšak v 1% postihuje i muže. Tato malignita má vyšší incidenci s přibývajícím věkem a nejčastěji postihuje věkovou kategorii nad 40 let s nejvyšším rizikem mezi 50. a 60. rokem života. V České republice připadá na 100 000 žen 105 pacientek, z nichž ročně 37 na rakovinu prsu zemře. Mortalita oproti incidenci tohoto onemocnění stagnuje, v posledních letech dokonce mírně klesá, čímž se zvyšuje prevalence této malignity (Zdeněk Adam 2010).

Jako většina malignit, nádor prsu představuje komplexní multifaktoriální onemocnění, jehož vznik je podmíněn interakcí genetických a environmentálních faktorů. Mezi rizikové faktory spadá především zmíněný vyšší věk, rodinná predispozice, dietní faktory či stavy způsobující delší expozici estrogenům (pozdní menopauza, časná menarche či dlouhodobé užívání estrogenů a gestagenů v rámci substituční léčby). Přibližně 5-10% karcinomu prsu je podmíněno geneticky. Nejčastěji se vyskytují mutace v rámci dvou genů *BRCA1* a *BRCA2* (z angl. *BReast CAncer*). Gen *BRCA1* je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 17 (17q21) a gen *BRCA2* je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 13 (13q12.3) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/675>). Oba tyto geny jsou spojeny s až 85% celoživotním rizikem pro vznik nádoru prsu. Proteiny kódované těmito geny jsou významné pro udržení stability a integrity genomu. Tyto proteiny jsou součástí multiproteinových komplexů účastnících se homologní rekombinace a reparačních mechanismů indukovaných poškozením DNA. Podílejí se ale i na remodelaci chromatinu, regulaci transkripce či buněčného cyklu (Ruffner and Verma 1997), (Zdeněk Krška 2014) (Vymetalkova, Soucek et al. 2015) (Joseph Panno 2005).

### 2.4.4 Nádor vaječníků

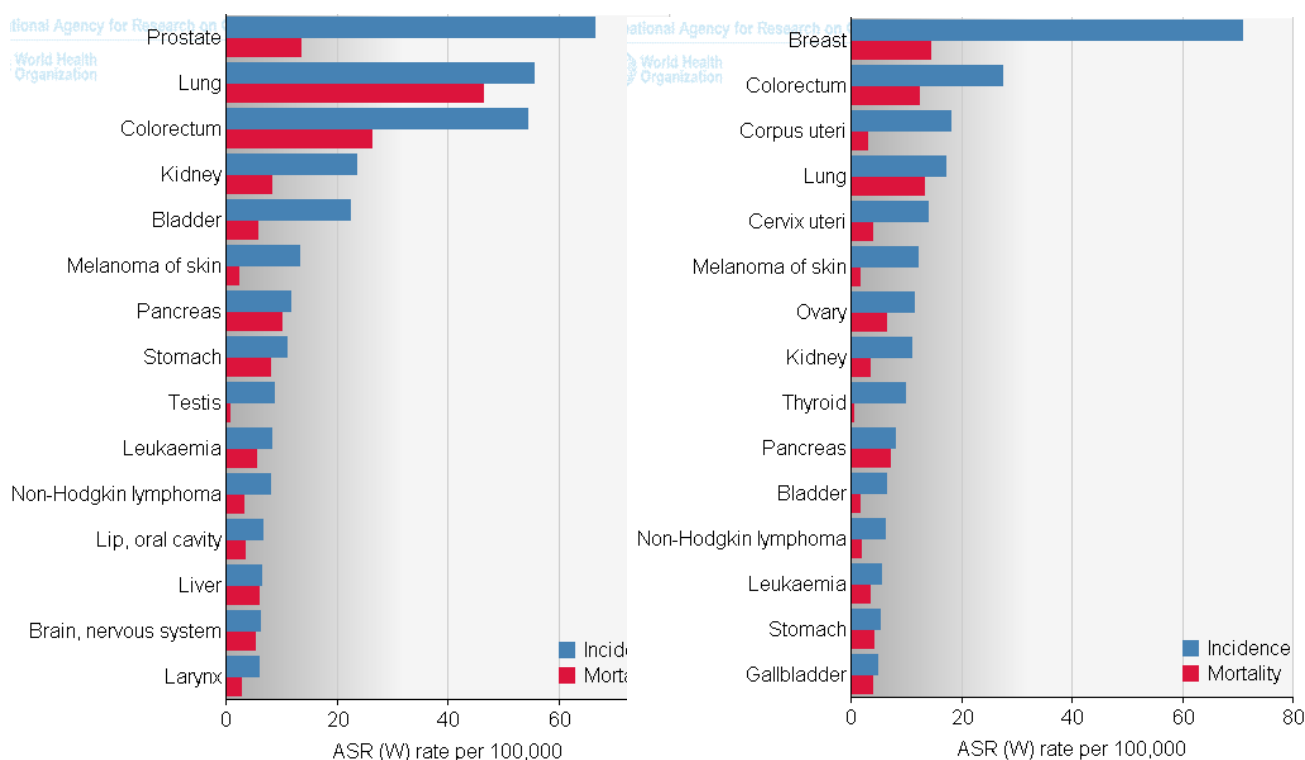
Nádor vaječníků patří mezi gynekologické zhoubné nádory a představuje nejčastější příčinu úmrtí žen v celosvětovém měřítku. Ze všech zhoubných nádorů reprodukčních orgánů ovariální karcinom zaujímá 23% (Cibula a kol 2009). V ČR bylo



v roce 2010 nově diagnostikováno 1107 patientek s ovariálním karcinomem, což představuje asi 21 případů na 100 tisíc žen (Cibula a kol. 2009). Incidence tohoto onemocnění rapidně narůstá s věkem žen, kdy mezi nejrizikovější skupinu patří ženy kolem 60. roku života. Výskyt ovariálního karcinomu u mladších věkových skupin je většinou spojován s Lynchovým syndromem či s mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2* (Cibula a kol. 2009). Za následek vysoké mortality považujeme i fakt, že toto onemocnění je v časných stádiích téměř asymptomatické a většina patientek je proto diagnostikována až v pokročilejších stádiích onemocnění, kdy pětileté přežití patientek nepřekračuje 25% (Karlan et al. 2009).

Histologicky patří nádory ovárií mezi epiteliální a lze je rozdělit na karcinom I (tzv. „low-grade“) a II typu („high-grade“). U „low-grade“ typu se zpravidla vyskytují mutace v onkogenu *BRAF* a *KRAS* a tumor supresorového genu *PTEN*. Jedná se o typ nádoru s mírnější progresí a s delší dobou přežívání v porovnání s „high-grade“ typem. U druhého typu často nacházíme mutace v tumor supresorovém genu *p53* a inaktivaci tumor supresorového genu *p16* v důsledku hypermetylace promotorové oblasti tohoto genu (Cho and Shih 2009).

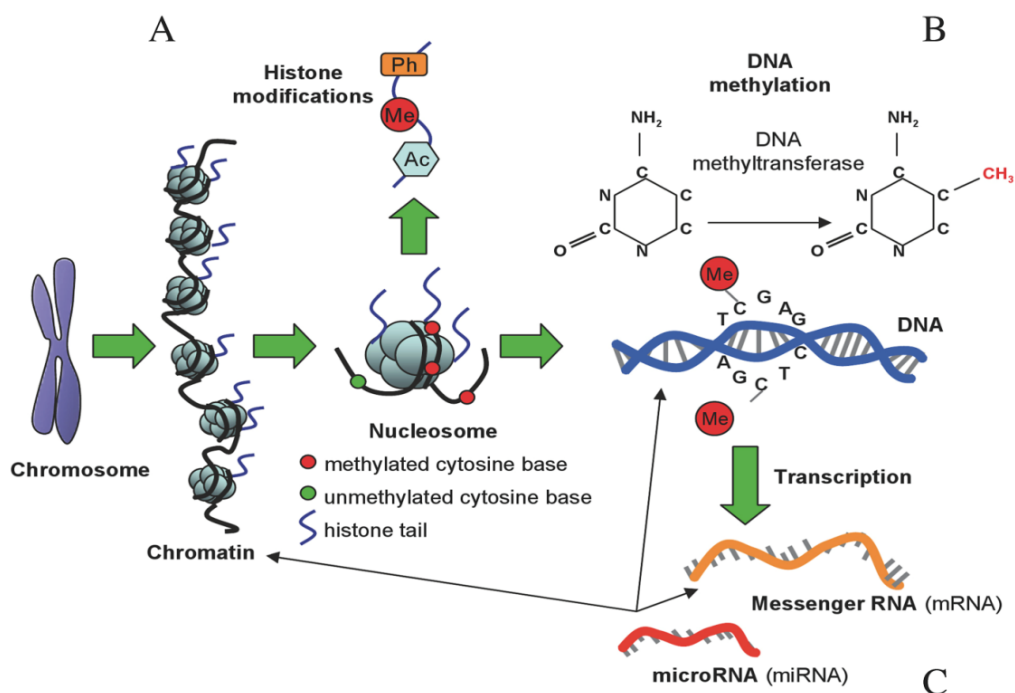
Obrázek 6 : Incidence a mortalita nádorových onemocnění u mužů (vlevo) a žen (vpravo). Převzato z (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>).



## 2.5 Epigenetické mechanismy regulace transkripce genů

Termín epigenetika poprvé zavedl a popsal v roce 1942 Conrad Hal Wadding, který epigenetiku definoval jako "odvětví biologie, které studuje kauzální interakce mezi geny a jejich produkty, které formují fenotyp" (Goldberg, Allis et al. 2007). Dodnes je definice oboru epigenetika mezi odborníky nejasná, avšak obecně lze epigenetiku popsat jako vědní obor, který studuje mitoticky i meioticky děděné změny v regulaci genů, které mohou být reverzibilní a nemění primární polynukleotidovou sekvenci DNA. Dochází tedy k pozměnění fenotypu, aniž by docházelo ke změně v genotypu (Berger, Kouzarides et al. 2009). Epigenetické mechanismy regulací mohou být rozděleny do tří hlavních kategorií: modifikace histonů, DNA metylace a postranskripční genová regulace nekódujícími RNA.

Obrázek 7 : Přehled epigenetických mechanismů.



Znázornění epigenetických mechanismů: A) modifikace histonů (metylace, acetylace, fosforylace), B) metylace DNA, C) miRNA. Převzato z (Gomez-Diaz, Jorda et al. 2012)

### **2.5.1 Modifikace histonů**

Histony se významně podílejí na výstavbě jaderného chromatinu. Jde o silně bazické proteiny, které v eukaryotické buňce vytváří společně s molekulou DNA tzv. nukleozóm. Rozlišujeme histony H2A, H2B, H3 a H4, které vytváří po dvou molekulách vždy od jednoho histonu oktamer, kolem kterého je navinuto cca 146 bází dsDNA (Simmons 2009). Existuje ještě histon H1, který není součástí oktameru a jehož funkce spočívá ve stabilizaci celého nukleozómu. Každý histon obsahuje globulární část a N(amino)-terminální část, která může podléhat velkému počtu post-translačních modifikací, např. metylaci, acetylaci, fosforylaci, ubikvitinaci, sumoylaci, apod. Mezi nejčastěji se vyskytující post-translační modifikace lysinů na N-terminálních doménách histonů je acetylace (Moss, Stephens et al. 1977) (Fletcher and Hansen 1996) (Inbar-Feigenberg, Choufani et al. 2013).

#### **2.5.1.1 Acetylce histonů H3 a H4**

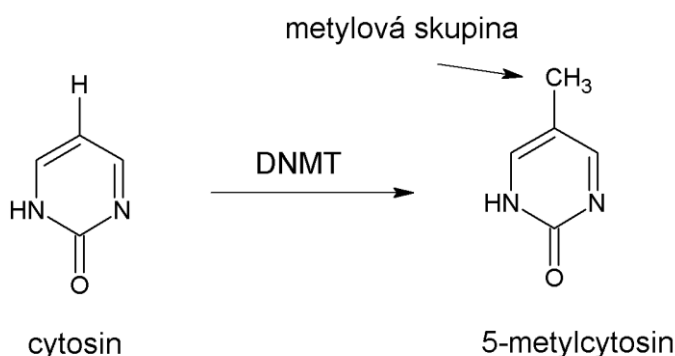
Lysínová rezidua na amino-terminálním konci histonů mají pozitivní náboj, vážou k sobě záporně nabitou DNA, čímž společně vytváří kondenzovanou chromatinovou strukturu, která je nepřístupná transkripčním faktorům. Lysínové zbytky jsou podrobeny buď acetylaci pomocí histon-acetyltransferáz (HAT) nebo deacetylaci prostřednictvím histon-deacetyláz. (HDAC) (Simmons 2009). Acetylce histonů ruší jejich pozitivní náboj a snižuje se tak afinita nejen mezi histony a DNA, ale také vzájemná interakce mezi jednotlivými nukleozómy, čímž dochází k rozvolnění chromatinové struktury, která se tak stává přístupná pro transkripční faktory a dochází k iniciaci transkripce, replikace či opravám DNA (Hong, Schroth et al. 1993) (Inbar-Feigenberg, Choufani et al. 2013). Donorem acetylové skupiny je acetylkoenzym A (acetyl-CoA). Naopak umlčování genů je spjato s deacetylací histonů, kdy dochází ke zvýšení jejich pozitivního náboje, následně k těsné vazbě histonů s molekulou DNA a dochází tak k remodelaci chromatinu na neaktivní (Hebbes, Thorne et al. 1988).

## 2.5.2 Metylace DNA

DNA metylace patří v současné době mezi nejvýznamnější a nejvíce studovaný epigenetický mechanismus (Sharma, Kelly et al. 2010). DNA metylace hraje nepostradatelnou úlohu v mnoha procesech, včetně vývoje organismu, při diferenciaci buněk, inaktivaci chromozomu X, genovém imprintingu a v neposlední řadě se při porušení metylačního vzoru podílí i na rozvoji rakoviny (von Kanel and Huber 2013).

DNA metylace představuje kovalentní připojení metylové skupiny ( $-\text{CH}_3$ ) na 5'uhlík pyrimidinového kruhu cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu (5mC). Donorem pro přenos metylové skupiny je S-adenosyl-L-metionin (SAM) (Simmons 2009) (Tibbetts and Appling 2010).

Obrázek 8 : Methylace cytosinu



*Při metylaci dochází kvažbě metylové skupiny na 5' uhlík cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu.*

K metylaci cytosínů dochází vyhradně v rámci sekvencí bohatých na tzv. CpG dinukleotidy (cytosin sousedící s guaninem, přičemž jsou báze spojeny fosfodiesterovou vazbou), které jsou koncentrovány do velkých klastrů nazývaných CpG ostrůvky, nejčastěji se vyskytující na 5'konci kódujících sekvencí, tj. v oblastech promotorů. Promotorové oblasti jsou DNA sekvence, do kterých se vážou proteiny, které buď spouští nebo reprimují genovou expresi (Suzuki and Bird 2008) (Gibney and Nolan 2010). CpG ostrůvky v promotorových oblastech zůstávají většinou ve zdravých tkáních nemetylované, proto za poruchy genové exprese je zodpovědná právě abnormální metylace.

U savců existují 3 hlavní enzymy zodpovědné za připojení metylové skupiny k cytosínu, nazývané DNA metyltransferázy (DNMT). Jedná se o udržovací

metyltransferázu DNMT1 a *de novo* metyltransferázy DNMT3a, DNMT3b (Hermann, Gowher et al. 2004) (Jurkowska, Jurkowski et al. 2011). Analýza genového vyřazení v myším modelu prokázala, že DNMT1, DNMT3a a DNMT3b jsou zásadní pro životaschopnost jedince, jinak dochází k abnormálnímu vývoji či letalitě embrya (Li, Bestor et al. 1992) (Okano, Bell et al. 1999)

Udržovací DNMT1 vykonává svou funkci během replikace, je charakteristická svou vysokou afinitou k hemimetylované DNA a metyluje nově vznikající řetězec podle původního řetězce sloužícího jako templát metylačního vzoru (Pradhan, Bacolla et al. 1999) (Inbar-Feigenberg, Choufani et al. 2013). DNMT3A a DNMT3b jsou zodpovědné za *de novo* metylaci DNA, a to především, v raném vývoji savců, kdy určují základní DNA metylační model daného organismu (Okano, Bell et al. 1999) (Pawlak and Jaenisch 2011).

### 2.5.3 Nekódující RNA

Ačkoliv je v eukaryotické buňce transkribováno přes 75% genomické DNA, pouhé 3% těchto transkriptů kódují proteiny. Drtivá většina transkriptů představuje regulační ncRNA, klasifikovaných podle jejich funkce a velikosti. Jedná se především o malé interferující RNA, (siRNA), microRNA (miRNA) a dlouhé nekódující RNA (lncRNA). Všechny tyto ncRNA hrají důležitou roli v regulaci genové exprese. Na úrovni transkripce, translace, při degradaci mRNA a při sestřihu (Carthew and Sontheimer 2009).

MiRNA představují třídu endogenních, 18-24 nukleotidů dlouhých RNA. Biogeneze těchto molekul je komplexní proces, při němž jsou z velkých primárních transkriptů (pri-miRNA) o délce až několik kilobází komplexem enzymů (RNázou zvanou Drosha a RNA vázajícím proteinem Pasha) naštěpeny úseky pre-miRNA o délce přibližně 70 nukleotidů (Lee, Ahn et al. 2003). Vzniklé pre-miRNA jsou v podobě vlásenkových struktur transportovány do cytoplazmy, kde jsou následně štěpeny RNázou III (Dicer) na dvojřetězcové miRNA o cílové délce přibližně 22 nukleotidů (Lee, Ahn et al. 2003). Následně je jedno vlákno z duplexu miRNA degradováno a druhé asociuje s tzv. komplexem RISC (RNA indukovaný umlčovací komplex), který navede příslušnou miRNA na 3'UTR (3'nepřekládaná oblast) cílové mRNA (Lee, Ahn et al. 2003). MiRNA se však s cílovou mRNA páruje nedokonale, nezpůsobuje tedy rozštěpení

a degradaci, ale zabraňuje translaci a potlačuje tak syntézu polypeptidů z mRNA. Schopnost miRNA vázat se s 3'UTR oblastí mRNA i v případě nedokonalé komplementarity je dáno velkým množstvím cílových mRNA pro jednotlivou miRNA (Snustad et al. 2009) .

SiRNA jsou dvouřetězcové RNA obvykle o délce 21 nukleotidů. SiRNA vznikají stejnou biodegradační cestou jako miRNA, avšak ke své cílové molekule se váží zcela komplementárně (Zamore, Tuschl et al. 2000). Pomocí RISC je siRNA navedena na 3'UTR cílové mRNA, kdy po navázání dojde k rozštěpení a následně k degradaci cílové mRNA. Podílí se tak na post-transkripčním umlčování genové exprese (Carthew and Sontheimer 2009).

## **2.6 Principy použitých metod**

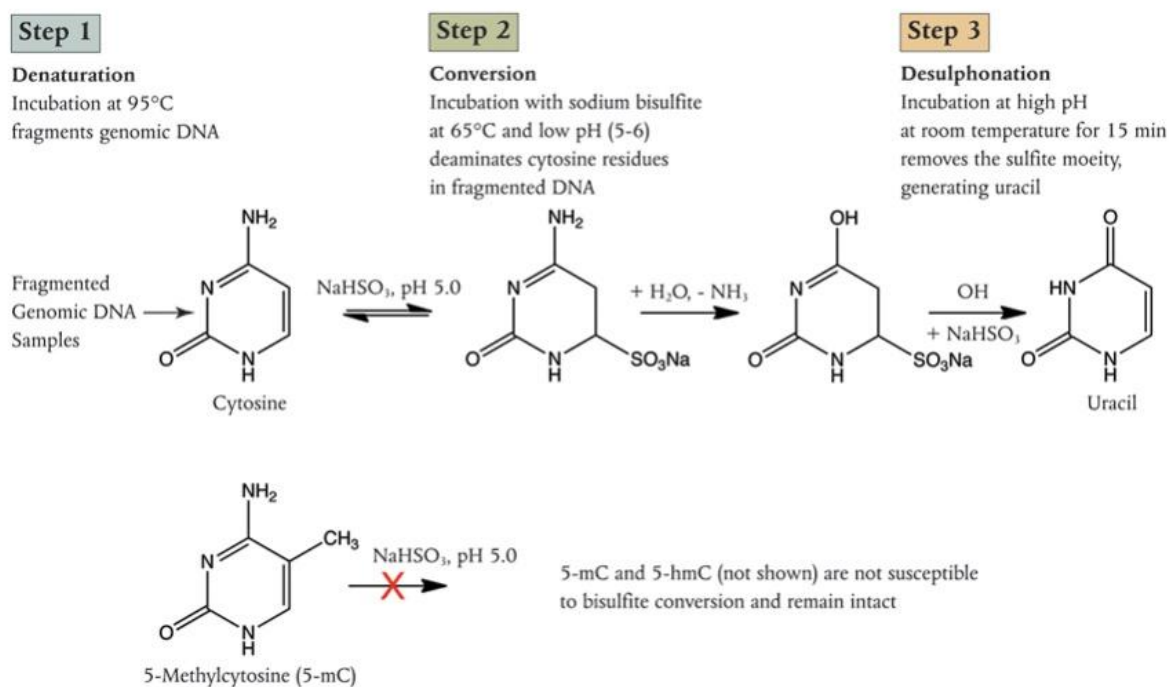
### **2.6.1 Bisulfitická konverze**

Využití bisulfitu sodného k přeměně nemetylovaných cytosinů na uracily bylo poprvé popsáno v roce 1970 nezávisle dvěma skupinami vědců (Shapiro et al 1970) (Hayatsu et al. 1970). Prvotní používání této metody představovalo poměrně tvrdý proces, který dramaticky měnil jak chemické, tak i fyzikální vlastnosti DNA. Vzhledem k poměrně nešetrným podmínkám pro DNA, jako je vysoká koncentrace solí s vysokými teplotami a nízkým pH, docházelo často k vysokému stupni DNA fragmentace a následně k vysokým ztrátám DNA během purifikace. Na konci dlouhé cesty v optimalizaci a stálého vylepšování podmínek pro ošetřování DNA bisulfitickou konverzí (BC) je komerčně dostupný protokol, který představuje, jednoduchý, efektivní, finančně nenáročný a rychlý proces. Dnes BC umožňuje konverzi nemetylovaných cytosinů na uracily za méně než 6 hodin, s výtěžností až 99% a s koncentrací vstupní DNA o 1 ng (Frommer, McDonald et al. 1992).

Princip ošetření DNA BC spočívá ve třech základních krocích (Obrázek 9):

1. Sulfonace: Připojení bisulfitu sodného  $\text{NaHSO}_3$  k uhlíku na páté pozici cytosinu za vzniku 5,6-dihydrocytosin-6-sulfonátu.
2. Hydrolytická deaminace: hydrolytickou deaminací je přeměněn vzniklý cytosin-bisulfit derivát (5,6-dihydrocytosin-6-sulfonát) na uracil-bisulfit derivát (5,6-dihydrouracil-6-sulfonát)
3. Alkalická desulfonace: v této fázi dochází k odstranění sulfonátové skupiny  $\text{SO}_3$  z pozice šestého uhlíku a k obnovení dvojné vazby mezi pozicemi C 5-6 za vzniku uracilu.

Obrázek 9 : Chemický průběh modifikace cytosinu na uracil. 5mC modifikaci nepodléhá.  
Převzato z (www.neb.com)



Reakce bisulfitické konverze je specifická pro jednovláknovou DNA a je tedy nutná denaturace dvouřetězcové molekuly na jednořetězcovou. Během BC se nemetylované cytosíny přeměňují na uracily, naopak 5mC jsou proti této přeměně chráněny a zůstávají nezměněny (Frommer, McDonald et al. 1992).

Obrázek 10. Znázornění přeměny cytosinu na uracily a rezistence 5mC

	Původní sekvence	Po ošetření BC
Nemetylovaná DNA	N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N	N- <b>U</b> -G-N- <b>U</b> -G-N- <b>U</b> -G-N
Metylovaná DNA	N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N	N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N- <b>C</b> -G-N

Výsledkem jsou tedy odlišnosti v DNA sekvenci, založené na metylačním stavu jednotlivých nukleotidů, které lze následně analyzovat pomocí metod založených na bisulfitické konverzi, například sekvenováním či MS-HRM.

## 2.6.2 Metylačně specifická analýza tání s vysokým rozlišením (MS-HRM)

MS-HRM představuje dosud bezkonkurenční alternativu Sangerova sekvenování, která umožňuje vysoce výkonné mutační skenování jednonukleotidových variant (SNPs, single nucleotide polymorphisms), menších delecí či inzercí (White et al. 2006), genotypizaci (Norambuena, Copeland et al. 2009) nebo právě metylační analýzu (Wojdacz, Dobrovic et al. 2008).

Principem MS-HRM techniky spočívá v analýze křivek tání s vysokým rozlišením. Tato metoda využívá skutečnosti, že během BC analyzované DNA se nemetylované cytosíny přemění na uracily, které jsou následně amplifikovány jako tymíny, zatímco metylované cytosíny této přeměně nepodléhají a jsou následně amplifikovány jako cytosíny. Metylované sekvence tak mají vyšší podíl C:G párů, a tím pádem i vyšší  $T_m$  (melting temperature) oproti sekvencím nemetylovaným.

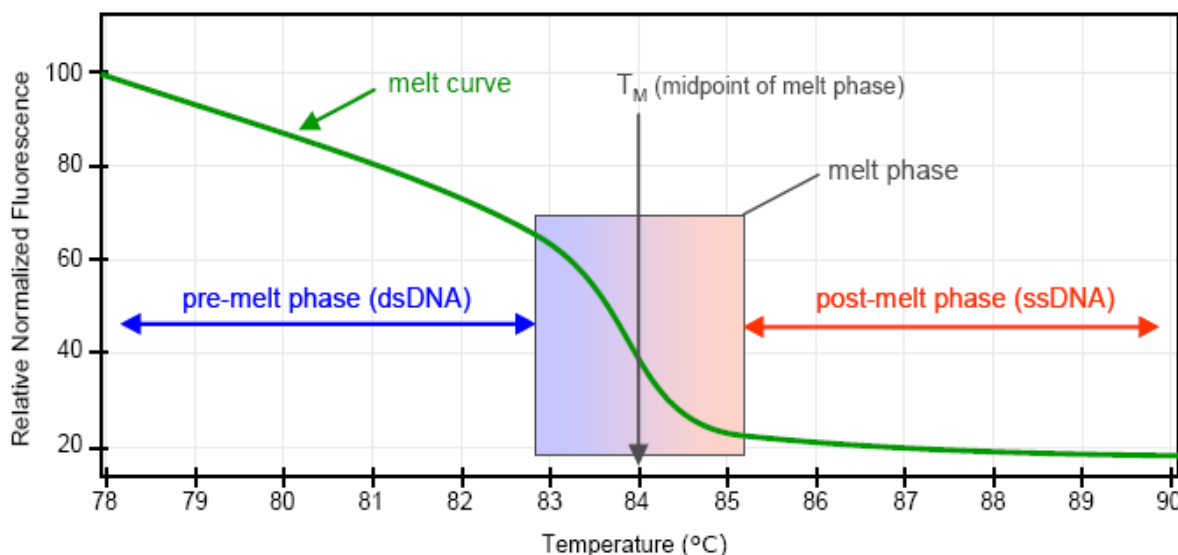
HRM je post PCR technika. Zkoumaná oblast DNA je nejprve amplifikována polymerázovou řetězcovou reakcí. Během tohoto procesu je speciální saturační fluorescenční barvivo inkorporováno do řetězce DNA a fluoreskuje pouze v případě, pokud je navázáno na dsDNA. Po PCR procesu následuje vlastní HRM analýza, během níž



je výsledný PCR produkt vystaven postupnému zvyšování teploty, nejčastěji v rozmezí, 50°C a 95°C, obvykle o 0,2 °C, čímž dochází k postupné denaturaci ("tání") dsDNA na ssDNA. Následkem této denaturace dsDNA se interkalující barvivo nemůže vázat a dochází tak k poklesu fluorescence, která je úměrná k míře denaturace (Reed, Kent et al. 2007). Intenzita fluorescence je snímána a zaznamenána přístrojem s citlivým fluorescenčním detektorem.

Výstupem je tzv. křivka tání, jejíž tvar závisí na vlastnostech analyzovaného vzorku, zejména na sekvenci, obsahu G:C párů a délce ampliconu. Výsledná křivka tání popisuje závislost intenzity fluorescence na teplotě. Na křivce rozlišujeme tři základní části: Za prvé tzv. pre-melt fázi, která zobrazuje stav, kdy je DNA přítomna ve své dvouřetězcové formě (dsDNA). V této fázi je fluorescence nejsilnější. Ve druhé, tzv. melt fázi (fázi tání) dochází díky postupnému zvyšování teploty k denaturaci dvouřetězcové molekuly, což se projeví prudkým poklesem fluorescence. V poslední fázi, v tzv. post-melt fázi je DNA přítomna již jen v jednořetězcové formě (ssDNA) a intenzita fluorescence je zde tedy nejslabší (Obrázek 11)..

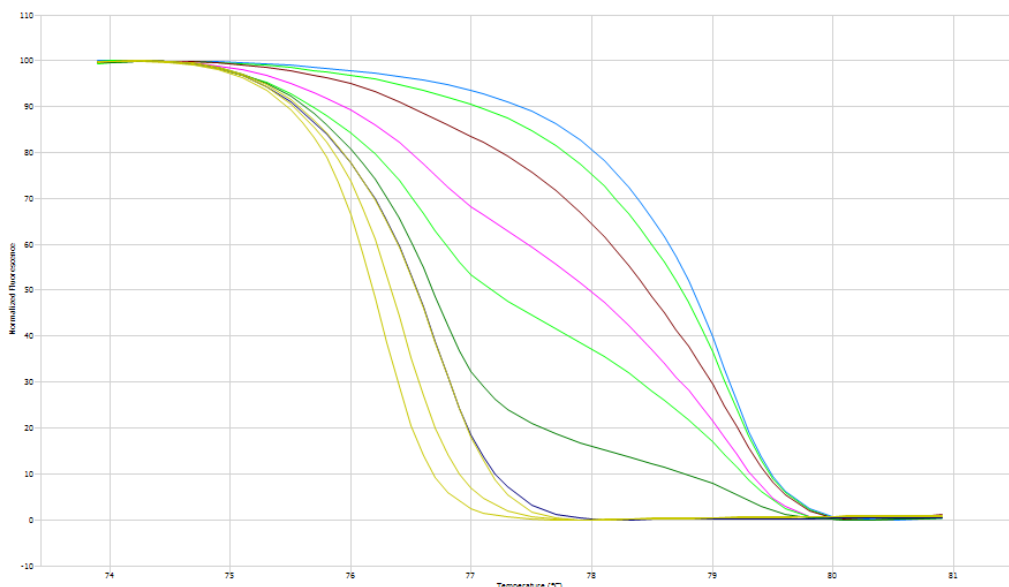
Obrázek 11 : Křivka tání. Převzato z (manuál CorProtocol 6000, Corbett, 2006)



*Přechod křivky tání (zeleně) z pre-melt fáze s nejsilnější fluorescencí, přes prudký pokles fluorescence v melt fázi, na post-melt fázi s nejslabší fluorescencí.*

Společně s analyzovanými vzorky jsou v reakci i standardy o známé úrovni metylace, se kterými jsou vzorky porovnávány a následně odečítány.

Obrázek 12 : Příklad výstupu křivek tání. Barevně jsou označeny standardy: 100%, 90%, 75%, 50%, 35%, 15%, 0%. Žlutě jsou znázorněny vzorky s úrovní metylace.



MS-HRM je velice rychlá, finančně i technicky nenáročná metoda a přesto představuje vysoce výkonný a senzitivní nástroj pro detekci metylací (Er and Chang 2012). Vyžaduje pouze použití standardních PCR reagensů, speciální interkalující se fluorescenční barvivo a přístroj pro HRM. Neméně důležitá výhoda této metody spočívá v tzv. systému "uzavřené zkumavky", kdy amplifikace i samotná analýza probíhá ve stejné zkumavce bez nutnosti další post-PCR manipulace a tím se minimalizuje riziko kontaminace (Gundry, Dobrowolski et al. 2008). Metoda je považována za nedestruktivní a PCR produkty je možné po HRM analýze ještě následně použít pro další zpracování, např. sekvenční analýzou či elektroforézou.

### 2.6.3 Gelová elektroforéza

Elektroforéza patří mezi nejpoužívanější separační techniky, která umožňuje dělení látek v elektrickém poli podle jejich velikosti a náboje. Nukleové kyseliny (NK) nesou díky fosfátové skupině záporný náboj a v zásaditém prostředí se pohybují od záporně nabitých elektrod (katod) směrem ke kladně nabitým elektrodám (anodám).

Elektroforéza se zpravidla provádí na nosičích v podobě gelu umístěného v elektroforetickém pufru. Dle velikosti separovaných molekul používáme gel polyakrylamidový (100-1000bp) či agarózový (100-50 000bp). Gel představuje poměrně složitou síť polymerních molekul s póry a vytváří tzv. molekulové síto, ve kterém větší molekuly procházejí pomaleji, než molekuly menší. Pro detekci NK se obvykle přímo do gelu přidává interkalující barvivo, které se vmezeřuje do párů bazí NK putující gelem. V dnešní době existuje velké množství komerčně dostupných barviv, nejčastěji SYBR green, GoldView, GelRed, Midori, Stanin či Ethidium bromid. Vizualizace probíhá v UV transluminátoru, kdy po osvětlení UV zářením interkalované barvivo fluoreskuje. Pro stanovení či ověření velikosti separovaných fragmentů DNA se spolu se vzorky na gel nanáší tzv. hmotnostní/velikostní standard – směs fragmentů o známé délce (Kašička 1997).

Výhodami elektroforézy oproti ostatním separačním technikám jsou snadná příprava, cenová nenáročnost, relativní odolnost v manipulaci, možnost separovat jak velmi nízké, tak naopak vysoké množství NK a snadná údržba jednoduchých aparatur.

### 3 Cíle diplomové práce

1. Hlavním cílem diplomové práce bylo **stanovení hladiny metylací v CpG ostrůvcích promotorových oblastí 14 kandidátních genů účastnících se metabolismu 5-FU**, u tří nezávislých skupin pacientů s CRC (dvě skupiny pacientů byly použity k validaci obdržенých výsledků).

2. Vedlejším cílem pak **rámcové porovnání stanovovaných parametrů uvedených genů ve vztahu k terapii 5-FU**.

Pro dosažení tohoto cíle bylo nutné získat vzorky tumorové a nenádorové tkáně alespoň od 100 pacientů. Nutností také bylo navrhnout páry primerů pro všech 14 kandidátních genů a optimalizovat podmínky pro MS-HRM.

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Sběr biologického materiálu**

V diplomové práci jsem použila vzorky tkání 128 pacientů. Vzorky byly získány od pacientů s diagnostikovaným CRC chirurgickou resekci z tumorové tkáně. Jako kontroly byly odebrány přilehlé zdravé tkáně pacientů (cca 20 cm od tumoru). Čtyřicet čtyři páry biologických vzorků byly poskytnuty paní Doc. MUDr. Ludmilou Lipskou, CSc. a MUDr. Miroslavem Levým, PhD. z Thomayerovy nemocnice v Praze, 62 párů bylo od MUDr. Michaely Schneiderové z VFN a 1.LF v Praze a 22 párů vzorků bylo získáno od pana MUDr. Václava Lišky, PhD z FN UK Praha se sídlem v Plzni. Odběry biologického materiálu byly schváleny příslušnými etickými komisemi v rámci příslušných projektů.. Odebrané tkáně byly uchovávány při teplotě -80°C. Izolovaná DNA z tkání pak při -20°C. Při teplotě -20°C byly uchovávány vzorky i po BC.

### **4.2 Spotřební materiál, reagentie, přístroje**

Špičky (VWR), zkumavky Eppendorf (Eppendorf), PCR destička (GeneTiCA), suchý led (Linde).

DNasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen), Primery (Sigma)

Pipety (Proline Plus BIOHIT), Laminární box (Telstar), Cycler na HRM (Eco Illumina), Cycler na BC (BioTech), Elektroforetická vana (Scie-Plas), UV transluminátor (UltraCam), Centrifuga typ 1204 (Hettich), NanoDrop2000 (LAB MARK)

### 4.3 Izolace DNA z tkání

Genomovou DNA jsem z tkání extrahovala pomocí DNasy Blood & Tissue Kit podle příslušného protokolu.

Do 1,5 ml zkumavky jsem přidala 180  $\mu$ l pufru ATL. Do stejné zkumavky s pufrem jsem přidala kousek tkáně o velikosti 5-7 mm. Do zkumavky s pufrem a tkání jsem přidala 20  $\mu$ l proteinázy K. Následně jsem zkumavku 10 min protřepávala pomocí vortexu a nechala inkubovat 2-3 hodiny v inkubátoru předehřátého na 56°C. Po inkubaci jsem do zkumavky přidala 200  $\mu$ l lyzačního pufru AL. Zkumavku jsem opět protřepala pomocí vortexu a nechala inkubovat 10 min v inkubátoru předehřátého na 56°C. Poté jsem

do zkumavky přidala 200  $\mu$ l 96 % etanolu. Obsah jsem promíchala a celý objem kvantitativně přenesla na tzv. spin kolonku (s membránou) umístěnou ve 2 ml sběrné zkumavce. Následně jsem zkumavku s kolonkou centrifugovala při 8000ot/ min po dobu 1 min. Po centrifugaci jsem kolonku opět přemístila do nové 2 ml sběrné zkumavky. Na kolonku jsem přidala 500  $\mu$ l pufru AW1. Kolonku ve sběrné zkumavce jsem centrifugovala 8000ot/ min po dobu 1 min. Kolonku jsem po centrifugaci přemístila opět do nové sběrné 2 ml zkumavky a na kolonku přidala 500  $\mu$ l pufru AW2. Následně jsem zkumavku s kolonkou centrifugovala při 14000ot/ min po dobu 3 min (do této fáze byla DNA zachycována na membráně spin kolonky). Po centrifugaci jsem kolonku přemístila do nové 1,5 ml zkumavky. Na kolonku jsem přidala 75  $\mu$ l pufru AE a nechala inkubovat po dobu 1 min při pokojové teplotě. Poté jsem zkumavku s kolonkou centrifugovala 8000ot/ min po dobu 1 min. Po centrifugaci jsem na kolonku znovu přidala 75  $\mu$ l pufru AE a nechala inkubovat po dobu 1 min při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem zkumavku s kolonkou centrifugovala 8000ot/ min po dobu 1 min (do zkumavky tak byla ze spin kolonky získána výsledná DNA).

### 4.4 Měření koncentrace izolované DNA

Pro zjištění koncentrace a čistoty izolací získané DNA jsem použila přístroj Nano Drop 2000 spektrofotometr. K měření jsem použila 1  $\mu$ l vzorku. Koncentrace a čistota vzorku jsem stanovila na základě poměru absorpance při vlnové délce 260 nm ( $A_{260}$ ), 280 nm ( $A_{280}$ ) a 230 nm ( $A_{230}$ ) změřené přístrojem. Při poměru absorpancí 260/280 lze za „čisté“ nukleové kyseliny (NK) považovat s výsledným poměrem 1,8. Při poměru

absorbancí 260/230 pak s poměrem mezi 1,8 – 2,2. Nižší hodnota v obou případech indikuje znečištění vzorku. Pro určení počáteční nulové hodnoty jsem před vlastním měřením vzorků nanesla 1 µl blanku (eluční pufr AE).

## 4.5 Bisulfitická konverze

Třicet ng vyizolované DNA každého vzorku jsem ošetřila bisulfitem sodným pro přeměnu nemetylovaných cytosínů na uracily pomocí EpiTect Bisulfite Kit dle příslušného protokolu.

Do 0,2 ml zkumavky jsem napipetovala 20 µl 30 ng DNA, 85 µl bisulfitové směsi a 35 µl DNA Protect pufru. Směs jsem promíchala a zkumavku umístila do termocykleru (MJ Research PTC-200 PCR Systém) s nastaveným programem (Tabulka 1).

Tabulka 1 : Nastavený program v termocykleru dle příslušného protokolu

Krok	Čas (minuta)	Teplota (°C)
Denaturace	5	95 °C
Inkubace	25	60 °C
Denaturace	5	95 °C
Inkubace	85	60 °C
Denaturace	5	95 °C
Inkubace	175	60 °C

Zkumavku jsem po vyjmutí z termocykleru krátce centrifugovala a obsah kvantitativně přenesla do 1,5 ml zkumavky. Do zkumavky jsem přidala 560 µl pufru BL. Obsah zkumavky jsem promíchala a kvantitativně přenesla na spin kolonku (s membránou) umístěnou ve sběrné zkumavce. Zkumavku s kolonkou jsem centrifugovala při 14000 ot/ min po dobu 1 min. Po centrifugaci jsem spin kolonku přemístila do nové sběrné zkumavky. Na kolonku jsem přidala 500 µl pufru BD a nechala inkubovat 15 min při pokojové teplotě. Po inkubaci jsem zkumavku s kolonkou centrifugovala při 14000ot/ min po dobu 1 min. Po centrifugaci jsem kolonku opět přemístila do nové sběrné zkumavky. Na kolonku jsem přidala 500 µl pufru BW a kolonku ve sběrné zkumavce centrifugovala při 14000ot/min po dobu 1 min. Po centrifugaci jsem kolonku

přemístila do čisté 1,5 ml zkumavky. Na střed membrány kolonky jsem nepipetovala 20  $\mu$ l pufru EB. Kolonku v čisté zkumavce jsem centrifugovala při 12000ot/ min po dobu 1 min. Po centrifugaci jsem opět na střed kolonky přidala 20  $\mu$ l pufru EB a znovu centrifugala při 12000ot/ min po dobu 1min. Výsledný objem ve zkumavce byla BC zkonvertovaná DNA.

#### **4.6 Studované geny a sekvence primerů**

GpG ostrůvky nebo CpG místa jsem identifikovala pomocí Metyl Primer Express Software v 1,0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Stejný software jsem použila pro navrhování primerů pro bisulfitem sodným konvertované DNA báze. Při navrhování primerů jsem brala v úvahu jednak počet CpG míst v PCR amplikonu a jednak stejné teploty tání primerů ( $T_a$ ). Primery byly dodány v lyofilizovaném stavu. Následně jsem primery naředila vodou, RNázy prostou, jako zásobní roztoky o koncentraci 0,1 mM. Z tohoto zásobního roztoku jsem připravila pracovní roztoky primerů naředěné na konečnou koncentraci 10 mM. Zásobní roztoky jsem skladovala při -20°C a v případě potřeby jsem z nich pracovní roztok doředila.



Tabulka 2 : Primery, jejich sekvence, Ta, délky PCR produktů

Gen a označení primerů	sekvence primerů	Ta (°C)	PCR produkt (bp)
<b>gen TK1</b>			
TK1_8_61.5_forward	5'-AAGGTGAGGTTATTTGAGGGTT-3'	58	142
TK1_8_61_reverse	5'-TACTACCTAACTCCCCCAACAA-3'		
<b>gen PPAT</b>			
PPAT_4_60_forward	5'-GATGTTGTAGGGTGGAGTTAGTT-3'	56	126
PPAT_4_60_reverse	5'-AAAATTAATCCGTTACTCCCA-3'		
<b>gen RRM2</b>			
RRM2_2_60.5_forward	5'-TTAGTTTGGGTAGGGGTAAGG-3'	60	70
RRM2_2_60.5_reverse	5'-ACCCTTCCCATTAACATATACCAT-3'		
<b>gen RRM1</b>			
RRM1_7_60_forward	5'-AAATTTTTTTAGGGTTTTGATTG-3'	56	154
RRM1_7_59_reverse	5'-AACTCCAACCCAACTCC-3'		
<b>gen UCK2</b>			
UCK2_3_62_forward	5'-TTTATGGGGGAAGGGTAGG-3'	58	81
UCK2_3_62b_reverse	5'-AAAATCCTACGAAAAACCTCTC-3'		
<b>gen UCK1</b>			
UCK1_9_63_forward	5'-GAGGATAZZAATAGGTGTGGATGGTT-3'	56	115
UCK1_9_63_reverse	5'-AAACTCCCCCACACCTCT-3'		
<b>gen UMPS</b>			
UMPS_11_60_forward	5'-GTGTAGTTTTGGGGTTATTGGT-3'	59	171
UMPS_11_60.5_reverse	5'-CCTATCCTTTCCCTTCTAAAC-3'		
<b>gen TYMP</b>			
TYMP_9_62b_forward	5'-TTTGGGATTAGTGGGGAGTT-3'	58	169
TYMP_9_62_reverse	5'-AACTACCTCAAAAAAACCCAC-3'		
<b>gen UPP1</b>			
UPP1_5_60_forward	5'-AGTAGGGAGAGGATTAGGAAAGA-3'	58	90
UPP1_5_60_reverse	5'-CTACACTCTAACCCCCAAAAAC-3'		
<b>gen UPP2</b>			
UPP2_1_60_forward	5'-ATTTAGGATTGGTTTTATGGGTT-3'	58	83
UPP2_1_60_reverse	5'-ACCAAACCTCAAAACCTTCTAA-3'		
<b>gen SLC29A1</b>			
SLC29A1_10_60_forward	5'-GGTCGTTTGTGTAGTTTTTTTT-3'	58	123
SLC29A1_10_60_reverse	5'-AACCCCTAATTCTCTCCCTC-3'		
<b>gen DPYS</b>			
DPYS_5_59_forward	5'-AGGTTGGGTTGGAGTTTAA-3'	58	199
DPYS_5_59_reverse	5'-TAAATTTCTTCCCTTTAACACC-3'		
<b>gen DPYD</b>			
DPYD_7_58_forward	5'-TTTATTGAGTATAGGGTTATGG-3'	56	141
DPYD_7_58_reverse	5'-CCGACCCTAATCTACCTATTT-3'		
<b>gen UPB1</b>			
UPB1_12b_61_forward	5'-GCGTGTTTTATTTGAGTTGTTT-3'	58	189
UPB1_12_61_reverse	5'-AATACTTCTCCAACATTCTCC-3'		

## 4.7 Metylačně specifická HRM

Pro detekci a analýzu metylací metodou MS-HRM jsem použila přístroj LightCycler 480 a komerčně dodávaný kit EpiTect HRM PCR Kit a EpiTect Control DNA (100% metylovaná a 100% nemetylovaná kontrolní DNA). Pro snížení rizika kontaminace jsem veškerou manipulaci se vzorky a reagensii prováděla v laminárním boxu. Postupovala jsem dle uvedeného protokolu.

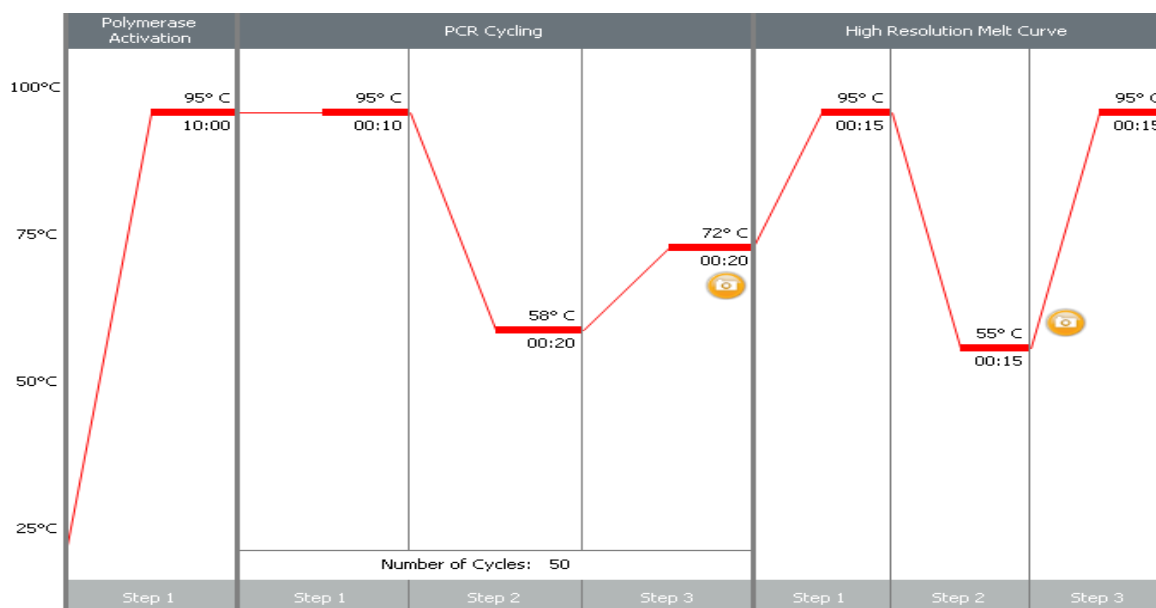
Nejprve jsem do jamek destičky nepipetovala směs HRM Master Mixu, příslušných primerů a vody. Následně jsem do připravené směsi v jamkách přidala jednotlivé vzorky a standardy. (Tabulka 3.):

Tabulka 3 : Reagencie a jejich množství použitých při MS-HRM

Reagencie (koncentrace)	Množství v PCR reakci (10 $\mu$ l)
HRM Master Mix	5 $\mu$ l
Primer_forward (10 $\mu$ M)	0,3 $\mu$ l
Primer_reverse (10 $\mu$ M)	0,3 $\mu$ l
RNase-free water	3,4 $\mu$ l
Templát (DNA/standard)	1 $\mu$ l

Všechny analýzy jsem prováděla v cycleru za stejných následujících podmínek: V prvním kroku byla při 95 °C po dobu 10 min aktivována polymeráza. V druhém kroku probíhala PCR v 50 cyklech. Tento krok zahrnoval fázi denaturace (95°C/10s), fázi nasednutí primerů (56-58°C/20s dle  $T_a$  použitých párů primerů) a fázi elongace (72°C/20s). V třetím kroku probíhal vlastní cyklus analýzy křivek tání (95°C/15s, 55°C/15s a 95°C/15s); (Obrázek 13).

Obrázek 13 : Ukázka zvoleného programu a podmínek pro MS-HRM



Všechny vzorky jsem analyzovala v duplikátu, standardy v monoplikátu. Kontrolní, 100% metylovaná a 100% nemetylovaná DNA, jsem ředila pro získání standardů se 100%, 90%, 75%, 50%, 35%, 25%, 15%, 10%, 5%, 1% a 0% úrovní metylace. Výsledné křivky tání vzorků o neznámé úrovni metylace jsem porovnávala a odečítala od standardů o známých hladinách metylací.

#### 4.8 Gelová elektroforéza

Pro ověřování správných délek PCR produktů jednotlivých primerů a přítomnost nežádoucích primerů-dimerů jsem použila gelovou elektroforézu.

Připravila jsem 2 % agarózový elektroforetický gel: 1g agarózy jsem rozpustila v 50 ml pufru TBE. Následně jsem přidala 5 µl fluorescenčního barviva Staninu. Roztok jsem zahřála na 85-95°C a následně nalila do formičky. Vychladnutý gel jsem z formičky přemístila do elektroforetické vany a zalila pufrem TBE. Jednotlivé vzorky a standardy jsem nanášela do jamek vytvořených odstraněním hřebínku ze ztuhlého gelu. Po 40 min působení stejnosměrného elektrického proudu jsem agarózový gel přemístila do UV transluminátoru. Po digitálním vyfocení gelu jsem porovnávala a odečítala délky PCR produktů od standardů o známých délkách.

## 4.9 Statistické hodnocení

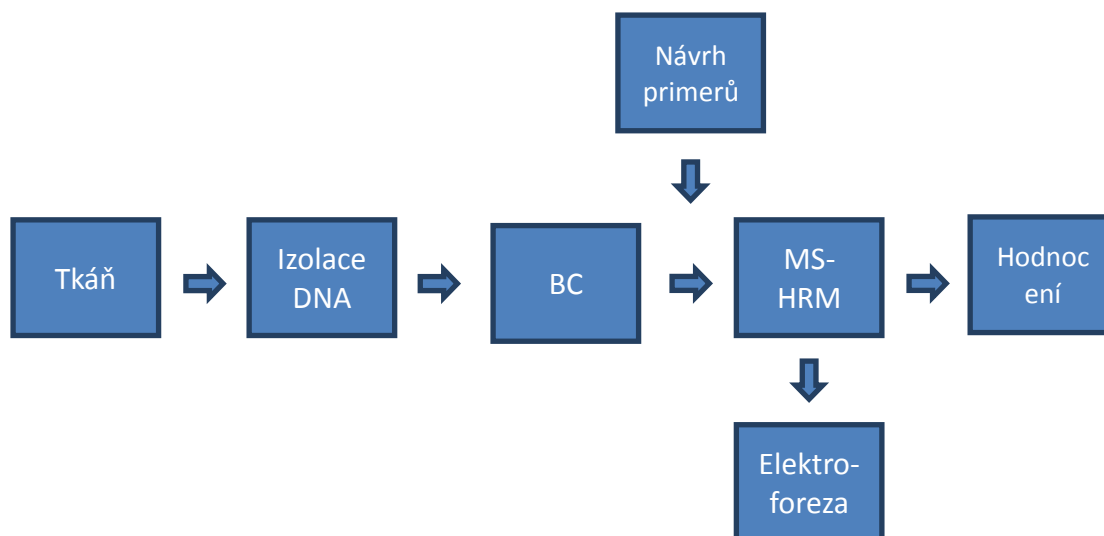
Statisticky významné rozdíly v hladinách metylací mezi tumorem a nenádorovou tkání jsem hodnotila neparametrickým Mann-Whitney U-testem. Relativní riziko úmrtí jsem hodnotila Long-rank testem. Křivky přežití pro celkové přežívání jsem odvozovala pomocí analýzy Kaplan–Meier programem SPSS a Prism software. Rovněž jsem hodnotila možné rozdíly mezi hypo- a hypermetylací genů ve vztahu k přežívání pacientů a ve vztahu k přežívání pacientů léčených 5-FU a jinými cytostatiky.

## 5 Výsledky

V rámci své diplomové práce jsem se podílela na komplexních studiích v rámci projektů „Molekulárně biologická a histopatologická charakteristika lymfocytů infiltrujících tumorózní tkáň jako nástroj predikce rizika časně recidivy kolorektálního karcinomu“, podpořeného Interní Grantovou Agenturou ministerstva zdravotnictví ČR (project.no.: NT/14329-3) a „Molekulární charakteristiky DNA opravy v nádorové tkáni tlustého střeva a konečníku“, podpořeného Grantovou agenturou ČR (project no.: P301/12/1585). Tato studie je pak součástí dílčího projektu "Molekulární profil genů podílejících se na dráze 5-FU u kolorektálního karcinomu", řešeného Doc. RNDr. Pavlem Součkem, CSc. a MUDr. Pavlem Vodičkou, CSc.

Ve své diplomové práci jsem stanovovala úrovně metylací v promotorových oblastech celkem u 14 kandidátních genů podílejících se na metabolismu 5-FU u tří na sobě nezávislých skupin pacientů s CRC, tj. celkem u párových vzorků (tumoru a přilehlé nenádorové tkáně) 128 pacientů. Nejprve byla ze všech vzorků vyizolována genomická DNA, která byla následně ošetřena bisulfitickou konverzí pro přeměnu nemetylovaných cytosínů na uracily, při čemž 5mC této přeměně nepodléhá. Bylo navrženo všech 14 párů primerů pro promotorové oblasti jednotlivých kandidátních genů a byly stanoveny optimální podmínky MS-HRM pro co nejcitlivější rozlišení úrovní metylací jednotlivých standardů, resp. vzorků. Správnost délek PCR produktů při použití navržených primerů byla ověřena pomocí gelové elektroforézy na agarózovém gelu a odečítána v UV světle transluminátoru. Posloupnost užitých metod při detekci metylací kandidátních genů je uvedena na obrázku 13.

Obrázek 13 : Posloupnost užitých metod při detekci metylací kandidátních genů



Velká většina studovaných genů, tj. *TK1*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *UCK2*, *UCK1*, *UMPS*, *TYMP*, *UPP1*, *SLC29A1* a *DPYD* nevykazovala žádnou úroveň metylace (tj. 0%). Pouze u tří studovaných genů, tj. *DPYS*, *UPB1* a *UPP2* byly nalezeny vyšší úrovně metylací (Tabulka 4).

V testovacím souboru pacientů nebyl v genu *UPP2* pozorován rozdíl v hladinách metylací mezi tumory a nenádorovou tkání. U genu *DPYS* byla hladina metylací vyšší v tumoru oproti tkáni nenádorové a u genu *UPB1* jsme pozorovali hladiny metylací vyšší v nenádorové tkáni oproti tumoru. Ve validačním souboru I. nebyl u genu *UPP2* pozorován rozdíl v hladinách metylací mezi tumorem a nenádorovou tkání. U genu *DPYS* byla hladina metylací vyšší v tumoru oproti tkáni nenádorové a u genu *UPB1* nebyl pozorován rozdíl v hladinách mezi tumorem a zdravou tkání. Ve validačním souboru II. nebyl u genu *UPP2* pozorován rozdíl v hladinách metylací mezi tumorem a nenádorovou tkání. U genu *DPYS* byla hladina metylací vyšší v tumoru oproti tkáni nenádorové a u genu *UPB1* nebyl pozorován rozdíl v hladinách mezi tumorem a nenádorovou tkání.

Tabulka 4 : Výsledky hladin metylací u genů *DPYS*, *UPB1*, *UPP2* u testovacího souboru (1-22), validačního souboru I. (23-84) a validačního souboru II. (85-128) pacientů (T-tumor, Z- zdravá/nenádorová tkáň).

T/Z	pacient	DPYS %	UPB1 %	UPP2 %	pacient	DPYS %	UPB1 %	UPP2 %
T	1	10	50	>50	65	25	75	>50
Z		5	35	>50		10	75	>50
T	2	40	40	>50	66	20	85	>50
Z		10	40	>50		10	70	>50
T	3	30	40	>50	67	8	65	>50
Z		10	65	>50		10	70	>50
T	4	70	60	>50	68	20	60	<50
Z		12	75	>50		7	80	<50
T	5	20	75	>50	69	20	80	>50
Z		8	60	>50		15	75	<50
T	6	12	55	>50	70	25	45	<50
Z		11	75	>50		20	65	>50
T	7	7	70	>50	71	15	55	50
Z		11	73	>50		10	100	>50
T	8	18	45	>50	72	50	75	>50
Z		12	70	<50		13	60	>50
T	9	18	45	>50	73	15	80	>50
Z		14	65	>50		10	90	>50
T	10	15	63	<50	74	25	75	>50
Z		3	73	<50		10	100	<50
T	11	20	55	>50	75	35	75	<50
Z		2	70	<50		15	60	>50
T	12	25	55	>50	76	30	40	>50
Z		5	70	<50		15	40	>50
T	13	5	65	<50	77	30	70	<50
Z		1	70	<50		15	70	<50
T	14	13	62	<50	78	25	70	>50
Z		7	70	<50		15	75	>50
T	15	10	45	<50	79	25	75	>50
Z		4	45	<50		15	80	>50

<b>T/Z</b>	<b>pacient</b>	<b>DPYS %</b>	<b>UPB1 %</b>	<b>UPP2 %</b>	<b>pacient</b>	<b>DPYS %</b>	<b>UPB1 %</b>	<b>UPP2 %</b>
T	<b>16</b>	7	35	<50	<b>80</b>	40	80	>50
Z		8	60	<50		15	60	>50
T	<b>17</b>	15	35	>50	<b>81</b>	15	75	>50
Z		4	55	>50		15	65	>50
T	<b>18</b>	16	35	50	<b>82</b>	25	40	>50
Z		1	40	<50		13	90	>50
T	<b>19</b>	10	75	<50	<b>83</b>	30	70	>50
Z		10	75	<50		17	95	>50
T	<b>20</b>	16	65	>50	<b>84</b>	15	80	>50
Z		8	75	>50		15	80	>50
T	<b>21</b>	16	70	>50	<b>85</b>	30	75	>50
Z		10	100	>50		30	75	>50
T	<b>22</b>	15	75	<50	<b>86</b>	10	70	>50
Z		10	70	>50		8	65	>50
T	<b>23</b>	25	100	>50	<b>87</b>	8	75	>50
Z		20	100	>50		20	75	>50
T	<b>24</b>	20	90	>50	<b>88</b>	35	75	>50
Z		20	90	>50		30	70	>50
T	<b>25</b>	15	90	>50	<b>89</b>	30	70	>50
Z		15	100	>50		20	95	<50
T	<b>26</b>	30	45	>50	<b>90</b>	45	100	<50
Z		20	75	>50		30	80	<50
T	<b>27</b>	23	70	>50	<b>91</b>	25	75	>50
Z		23	65	>50		10	80	>50
T	<b>28</b>	10	75	>50	<b>92</b>	50	95	>50
Z		8	60	>50		30	85	>50
T	<b>29</b>	20	85	>50	<b>93</b>	25	70	<50
Z		15	85	>50		30	70	>50
T	<b>30</b>	25	85	>50	<b>94</b>	45	65	>50
Z		20	80	>50		25	60	50
T	<b>31</b>	10	95	<50	<b>95</b>	15	65	<50
Z		5	90	<50		30	75	>50
T	<b>32</b>	35	95	>50	<b>96</b>	35	75	>50
Z		13	95	>50		25	75	>50



<b>T/Z</b>	<b>pacient</b>	<b>DPYS %</b>	<b>UPB1 %</b>	<b>UPP2 %</b>	<b>pacient</b>	<b>DPYS %</b>	<b>UPB1 %</b>	<b>UPP2 %</b>
T	<b>33</b>	30	90	>50	<b>97</b>	35	100	<50
Z		20	85	>50		25	100	<50
T	<b>34</b>	30	100	>50	<b>98</b>	25	65	<50
Z		20	100	>50		25	100	>50
T	<b>35</b>	20	100	>50	<b>99</b>	30	100	>50
Z		5	90	<50		15	95	<50
T	<b>36</b>	40	90	>50	<b>100</b>	25	70	>50
Z		25	100	>50		25	100	>50
T	<b>37</b>	30	100	>50	<b>101</b>	25	65	>50
Z		25	100	>50		10	65	<50
T	<b>38</b>	45	70	>50	<b>102</b>	10	65	<50
Z		25	75	>50		8	65	>50
T	<b>39</b>	8	95	>50	<b>103</b>	25	100	>50
Z		10	100	>50		25	95	>50
T	<b>40</b>	45	100	>50	<b>104</b>	35	100	<50
Z		25	90	>50		30	100	<50
T	<b>41</b>	40	70	<50	<b>105</b>	15	100	<50
Z		30	75	>50		5	95	<50
T	<b>42</b>	25	90	>50	<b>106</b>	45	85	>50
Z		10	100	>50		40	80	>50
T	<b>43</b>	15	75	>50	<b>107</b>	25	90	>50
Z		15	65	<50		25	95	>50
T	<b>44</b>	45	55	>50	<b>108</b>	25	100	>50
Z		35	75	>50		25	100	>50
T	<b>45</b>	35	55	>50	<b>109</b>	10	65	<50
Z		20	75	>50		20	75	>50
T	<b>46</b>	25	50	>50	<b>110</b>	35	70	<50
Z		15	65	>50		25	90	>50
T	<b>47</b>	20	75	>50	<b>111</b>	20	100	<50
Z		10	75	>50		25	90	>50
T	<b>48</b>	45	80	>50	<b>112</b>	30	75	<50
Z		40	75	>50		20	70	>50
T	<b>49</b>	45	70	>50	<b>113</b>	25	75	>50
Z		30	60	>50		25	75	>50

<b>T/Z</b>	<b>pacient</b>	<b>DPYS %</b>	<b>UPB1 %</b>	<b>UPP2 %</b>	<b>pacient</b>	<b>DPYS %</b>	<b>UPB1 %</b>	<b>UPP2 %</b>
T	<b>50</b>	50	85	>50	<b>114</b>	5	70	>50
Z		45	75	>50		15	65	>50
T	<b>51</b>	20	90	>50	<b>115</b>	40	70	>50
Z		25	90	>50		30	65	>50
T	<b>52</b>	20	85	>50	<b>116</b>	35	65	>50
Z		25	65	>50		20	85	>50
T	<b>53</b>	20	100	>50	<b>117</b>	35	70	>50
Z		20	90	>50		25	75	>50
T	<b>54</b>	20	85	>50	<b>118</b>	35	65	>50
Z		25	80	>50		30	65	>50
T	<b>55</b>	45	100	>50	<b>119</b>	35	60	>50
Z		20	100	>50		25	65	>50
T	<b>56</b>	15	95	>50	<b>120</b>	35	35	>50
Z		5	75	>50		35	35	>50
T	<b>57</b>	30	95	>50	<b>121</b>	40	55	>50
Z		25	100	>50		35	70	>50
T	<b>58</b>	25	100	>50	<b>122</b>	55	75	>50
Z		20	100	>50		40	75	>50
T	<b>59</b>	85	90	>50	<b>123</b>	10	65	<50
Z		20	95	>50		0	65	<50
T	<b>60</b>	35	100	>50	<b>124</b>	45	65	>50
Z		30	100	>50		1	65	<50
T	<b>61</b>	45	95	>50	<b>125</b>	30	75	>50
Z		40	95	>50		30	65	>50
T	<b>62</b>	25	100	>50	<b>126</b>	65	65	>50
Z		20	100	>50		65	95	>50
T	<b>63</b>	20	95	>50	<b>127</b>	15	100	<50
Z		15	90	>50		25	100	>50
T	<b>64</b>	30	60	>50	<b>128</b>	10	80	<50
Z		20	55	>50		25	85	>50

Na základě vyhodnocení hladin metylací pomocí Mann-Whitney U-testu jsme v žádném souboru pacientů nepozorovali statisticky významné rozdíly v hladině metylací mezi nádorovou a nenádorovou tkání u genů *DPYS*, *UPB1* a *UPP2* ( $P > 0,05$ ). Vyjimka se týkala genů *UPB1* a *DPYS* v testovacím souboru a u genu *DPYS* ve validačním souboru I. (Tabulka 5), kde jsme pozorovali statisticky významné rozdíly mezi tumorem a přilehlou nenádorovou tkání ( $P < 0,05$ ).

Tabulka 5 :  $P$ -hodnoty dle Mann-Whitney U-testu u genů *DPYS*, *UPB1* a *UPP2* u testovacího souboru, validačního souboru I a validačního souboru II.

Gen	Testovací soubor (n=22)	Validační soubor I. (n=62)	Validační soubor II. (n=44)
	$P$ -hodnota	$P$ -hodnota	$P$ -hodnota
<b>DPYS</b>	<b>0,001</b>	<b>0</b>	0,073
<b>UPB1</b>	<b>0,022</b>	0,652	0,447
<b>UPP2</b>	0,437	0,992	0,327

*Dle testu Mann-Whitney lze za statisticky významné rozdíly v hladinách metylací považovat hodnoty  $< 0,05$ .*

Naše výsledky byly rovněž validovány i za pomoci celogenomové analýzy hladiny metylací za využití Human Methylation 450K Bead chip. Námi analyzované CpG místa u genu *DPYS* byli obdobně spojovány se signifikantními rozdíly v hladině metylací mezi tumorem a okolní nenádorovou tkání. Dvě CpG místa (cg19841740, cg02944021) byla hypometylována v tumorové tkáni a dalších 5 CpG míst (cg09435415, cg14015441, cg16419441, cg10303487, cg16783744) bylo naopak asociováno s hypermetylací tumorové tkáně (Tabulka 6) (Farkas, Vymetalkova et al. 2014).

Tabulka 6 : Hypo- a hypermetylována CpG místa genu *DPYS* zjištěná pomocí celogenomové analýzy hladiny metylací

Beta diff	Gen	CpG site	adj.P.Val	Vztah k lokalizaci	vztah k CpG místům	NT	T	SD NT	SD T
-0,29	DPYS	cg19841740	9,21E <sup>-08</sup>	Body		0,81	0,52	0,05	0,19
-0,26	UPB1	cg03091668	2,82E <sup>-10</sup>	Body		0,77	0,5	0,04	0,13
-0,23	DPYS	cg02944021	3,97E <sup>-06</sup>	Body		0,72	0,49	0,06	0,18
0,22	DPYS	cg16783744	4,82E <sup>-07</sup>	Body	Island	0,42	0,64	0,1	0,13
0,22	DPYS	cg10303487	1,15E <sup>-05</sup>	1stExon	Island	0,34	0,57	0,11	0,16
0,25	DPYS	cg16419441	5,72E <sup>-06</sup>	Body	Island	0,5	0,76	0,14	0,16
0,26	DPYS	cg14015441	4,14E <sup>-06</sup>	TSS200	Island	0,22	0,48	0,09	0,19
0,28	DPYS	cg09435415	3,27E <sup>-07</sup>	TSS200	S_Shore	0,28	0,56	0,07	0,19

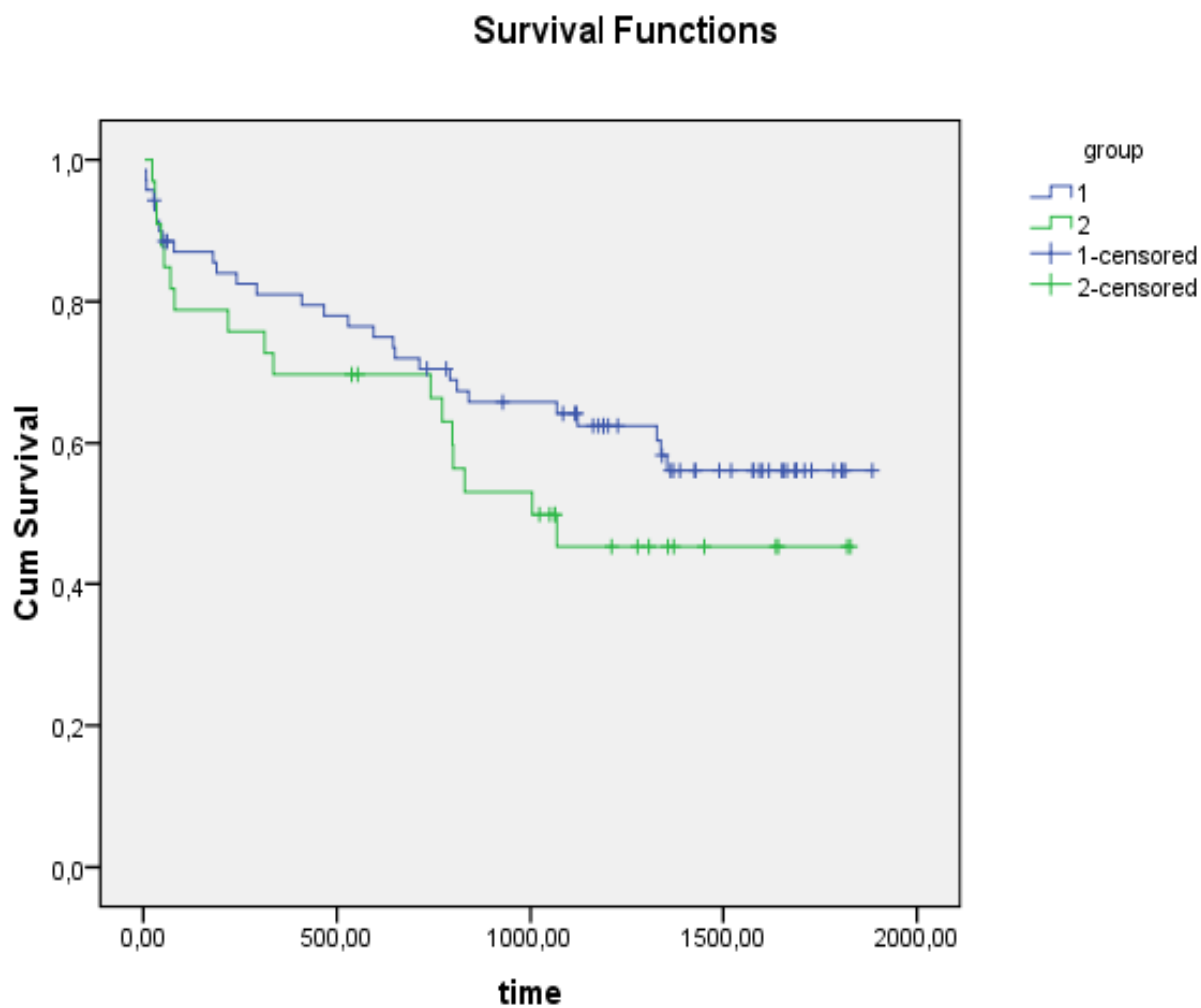
Negativní  $\Delta\beta$  - hodnoty odrážejí hypometylaci a pozitivní hypermetylaci v CRC tkáních;  $\Delta\beta$ , delta beta je hodnota rozdílů metylací; NT – nenádorová tkáň; T - tumor; SD -standardní odchylka; P - hodnota byla považována za statisticky významnou, pokud je <0,05.

Na základě klinických dat jsme u genů *DPYS*, *UPB1* a *UPP2* pomocí analýzy Kaplan-Meier vyhodnocovali významnost hladin metylací ve vztahu k prognóze pacientů u validačního souboru I a II. Ani u jednoho genu jsme nepozorovali vliv hypo- či hypermetylací u vybraných genů na prognózu, resp. přežívání pacientů.

Obrázek 14 : Doba přežívání pacientů ve vztahu k hladinám metylací u genu *DPYS*.

Modře jsou znázorněny hladiny **Hypermetylace** > 20% a zeleně **hypometylace** < 20%.

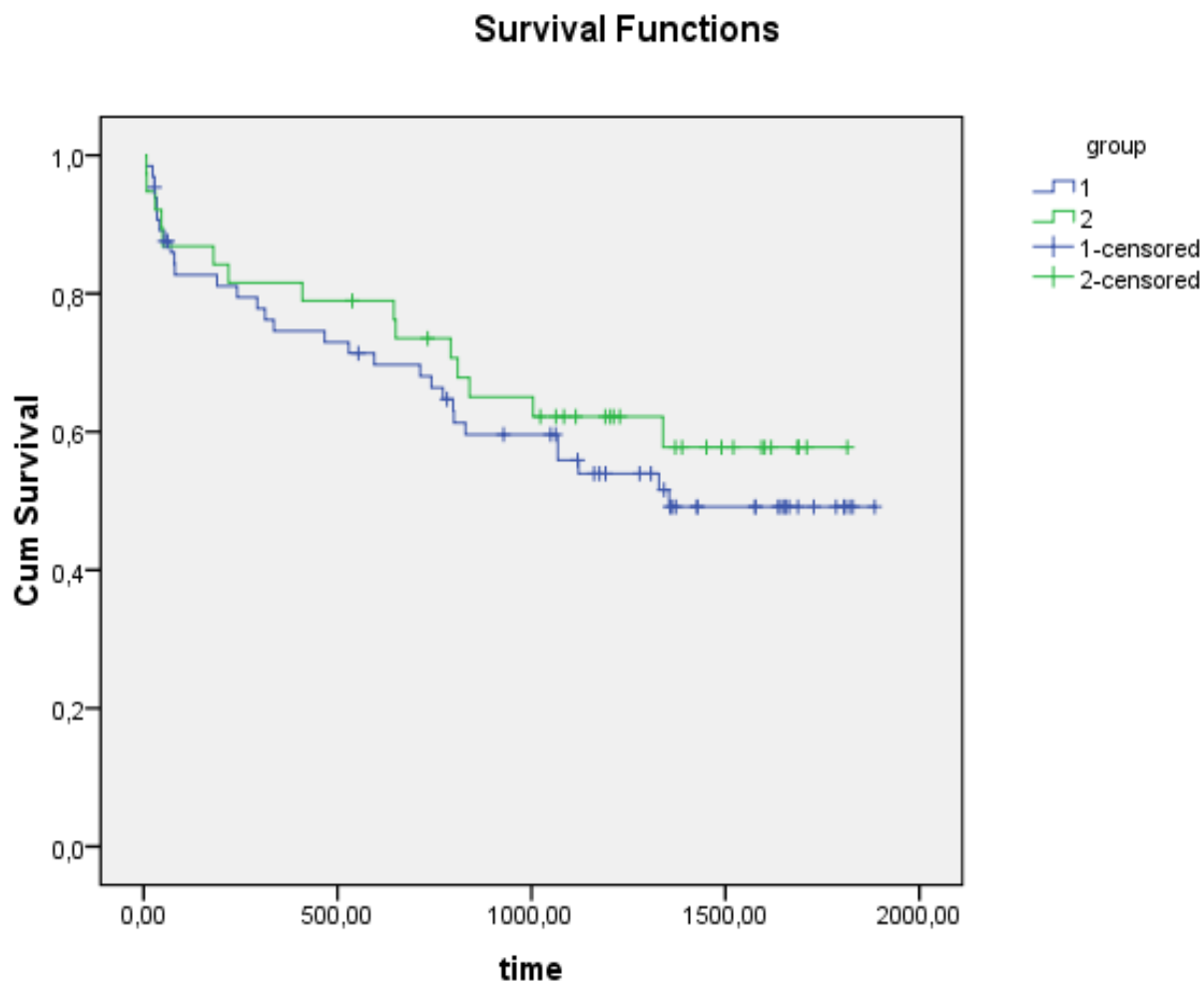
(Log Rank P=0,23)



Obrázek 15 : Doba přežívání pacientů ve vztahu k hladinám metylací u genu *UPB1*.

Modře jsou znázorněny hladiny **Hypermetylace** > 70% a zeleně **hypometylace** < 70%.

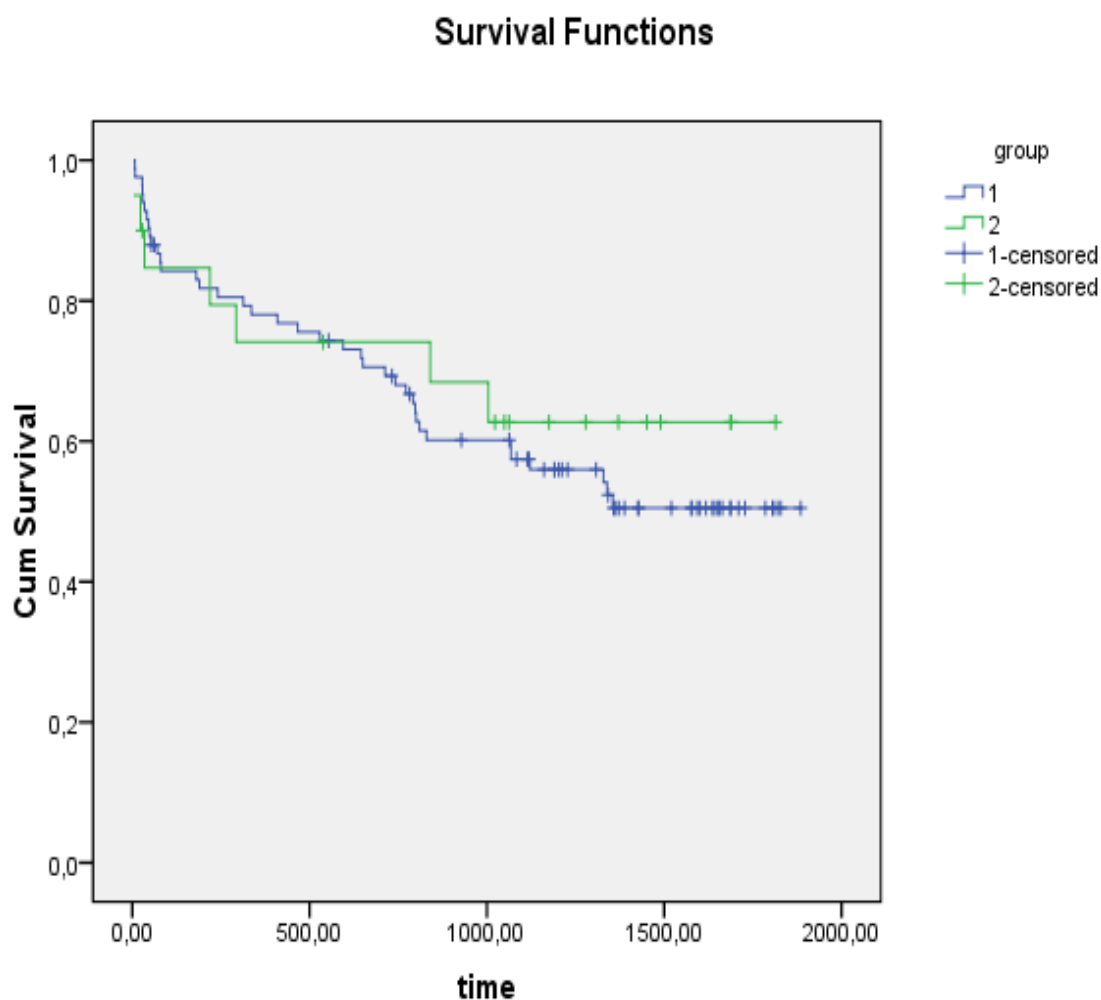
(Log Rank P=0,46)



Obrázek 16 : Doba přežívání pacientů ve vztahu k hladinám metylací u genu *UPP2*.

Modře jsou znázorněny hladiny **Hypermetylace** > 50% a zeleně **hypometylace** < 50%.

(Log Rank P=0,60)

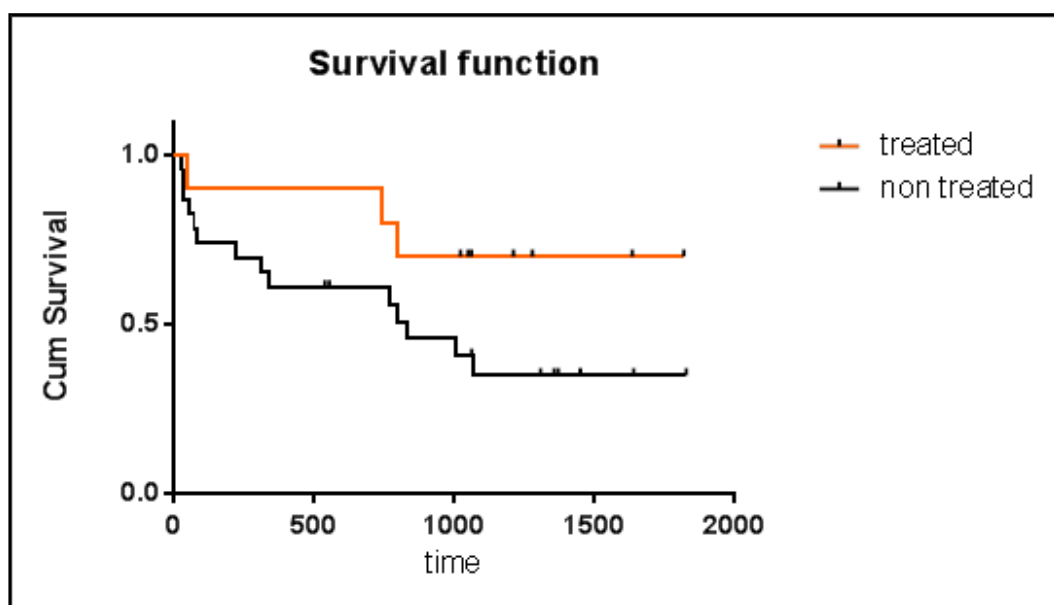


Vedlejším cílem této studie bylo rámcové porovnání stanovených parametrů uvedených genů ve vztahu k terapii 5-FU. Na základě klinických dat byli vybráni pacienti léčení pouze cytostatikem 5-FU a porovnávání s pacienty léčenými jinými chemoterapeutiky. Sledován byl vliv hypo- a hypermetylací v promotorových oblastech genů *DPYS*, *UPB1* a *UPP2* na přežívání pacientů léčených 5-FU. Významnost byla analyzována pomocí programu Prism software s analýzou Kaplan-Meier.

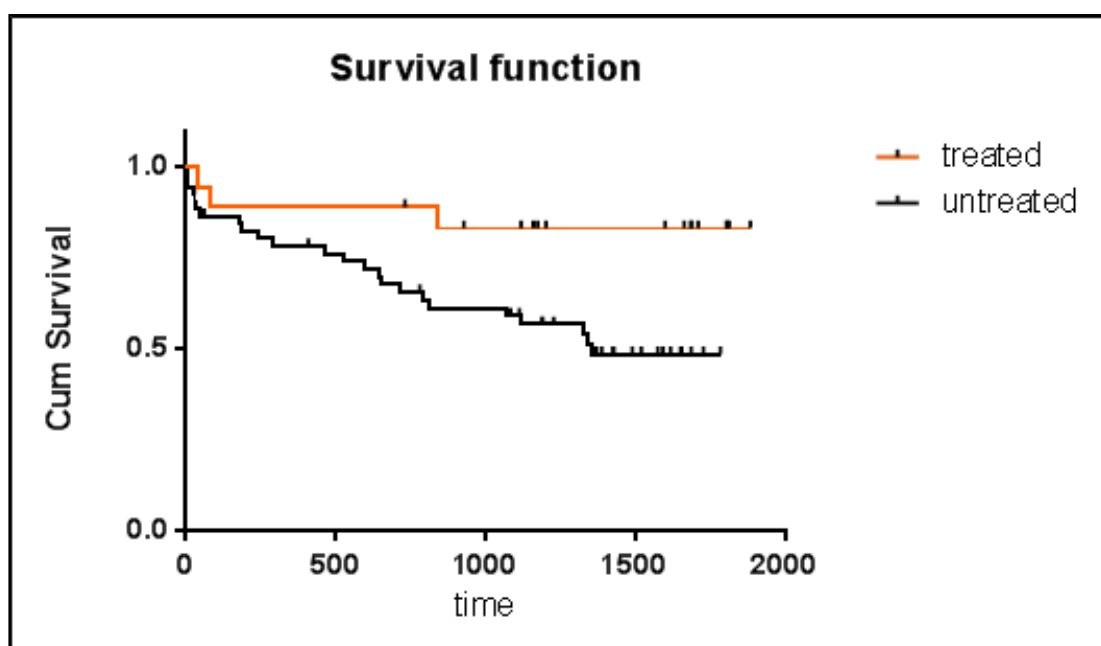
Za významné lze považovat rozdíl mezi pacienty s hypermetylací genu *DPYS*, kdy pacienti léčení 5-FU vykazují lepší prognózu oproti pacientům neléčených 5-FU (Obrázek 18). Stejnou významnost můžeme pozorovat i u hypermetylace genu *UPB1*,

kdy pacienti léčení 5-FU opět vykazují lepší prognózu oproti pacientům neléčených 5-FU (Obrázek 20).

Obrázek 17 : Porovnání přežívání pacientů léčených a neléčených 5-FU s hypometylací genu *DPYS*. (Log Rank  $P=0,10$ )

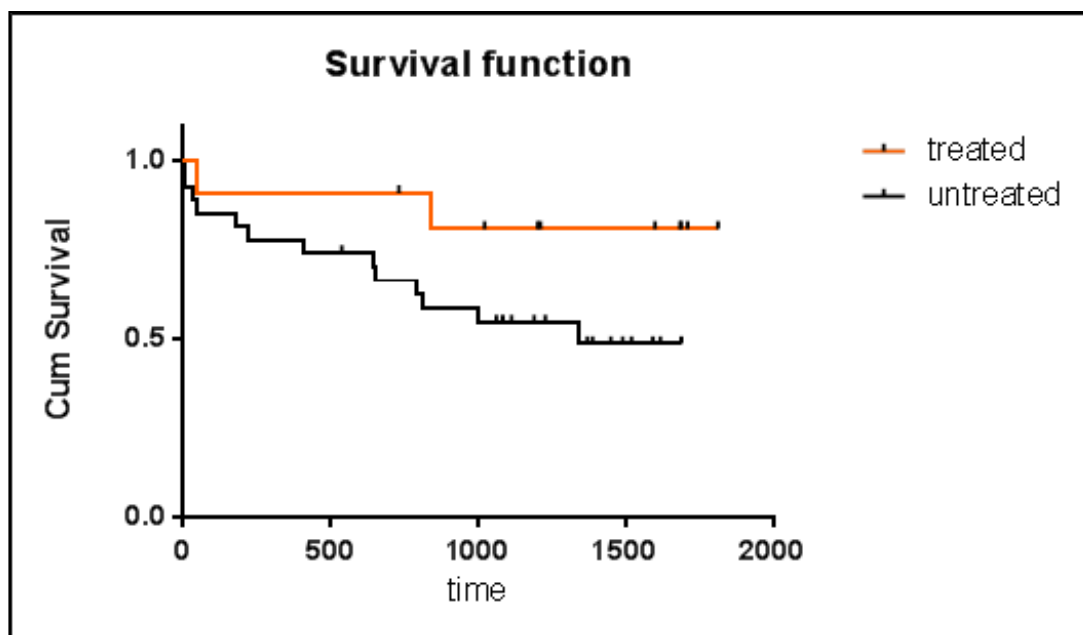


Obrázek 18 : Porovnání přežívání pacientů léčených a neléčených 5-FU s hypermetylací genu *DPYS*. (Log Rank  $P=0,032$ )

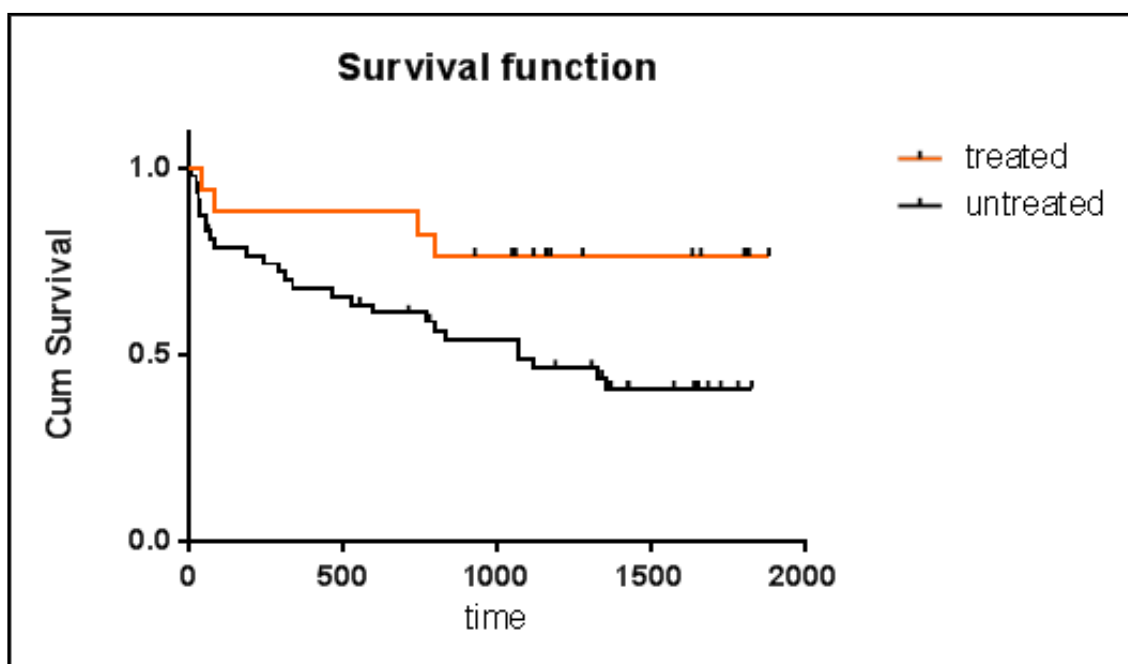




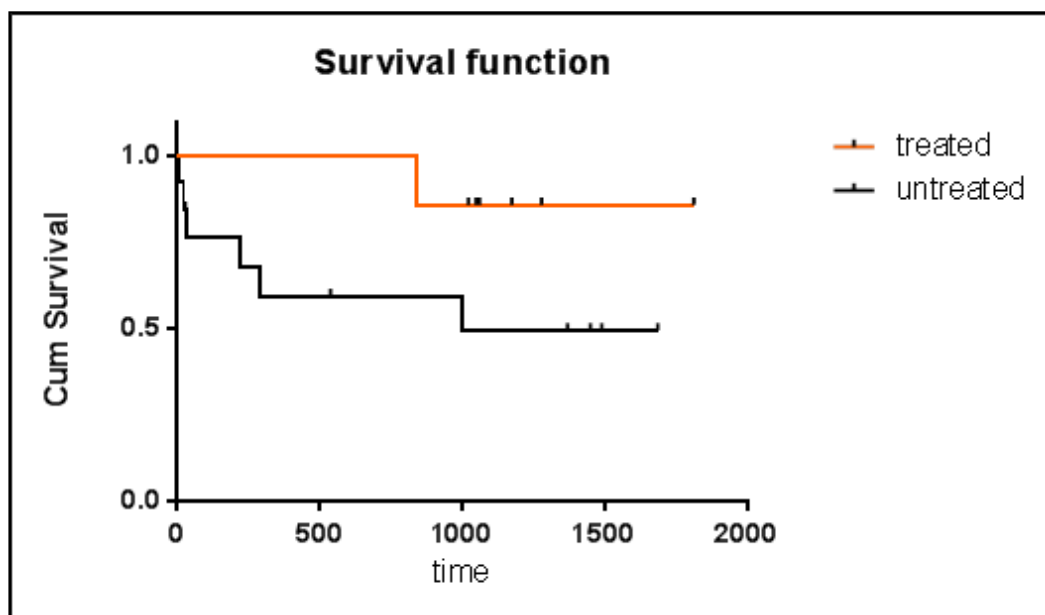
Obrázek 19 : Porovnání přežívání pacientů léčených a neléčených 5-FU s hypometylací genu *UPB1*. (Log Rank  $P=0,11$ )



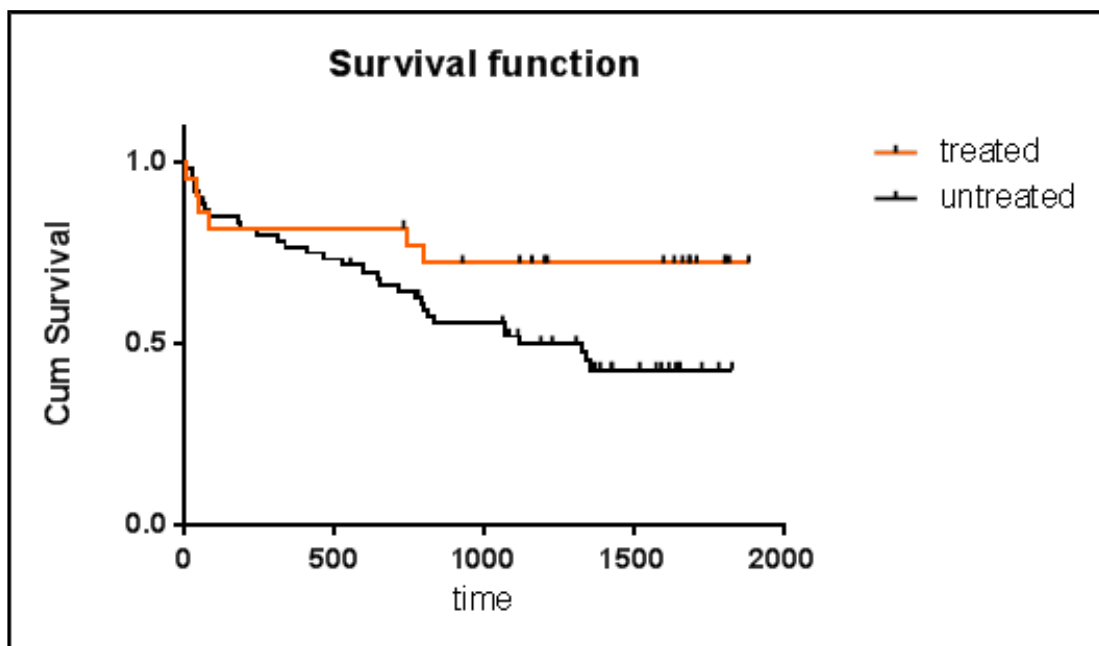
Obrázek 20 : Porovnání přežívání pacientů léčených a neléčených 5-FU s hypermetylací genu *UPB1*. (Log Rank  $P=0,039$ )



Obrázek 21 : Porovnání přežívání pacientů léčených a neléčených 5-FU s hypometylací genu *UPP2*. (Log Rank  $P=0,11$ )



Obrázek 22 : Porovnání přežívání pacientů léčených a neléčených 5-FU s hypermetylací genu *UPP2*. (Log Rank  $P=0,07$ )



Ve spolupráci s Doc. RNDr. Pavlem Součkem, PhD. ze SZÚ v Praze byl sledován vztah mezi hladinami metylací genů *DPYS*, *UPB1* a *UPP2* s jejich úrovní exprese. Na základě analýz provedených na pracovišti SZÚ bylo zjištěno, že hypermetylace promotorových oblastí v genech zahrnutých do biotransformace 5-FU nepostihuje jejich úroveň exprese (Kunicka T. 2015).

## 6 Diskuze

V lidské populaci na celosvětové úrovni, včetně ČR stále zaznamenáváme zvyšující se incidenci nádorových onemocnění a není pochyb, že se zájmy výzkumů soustřeďují na příčiny vzniku a možnosti léčby těchto onemocnění. 5-FU je nejčastěji ordinované cytostatikum v léčbě celé řady nádorových onemocnění a tak přirozeně čím dál více budí zájem pochopení jeho biotransformace v nádorových buňkách a znalost mechanismů ovlivňující jeho účinek v cílové buňce.

Do popředí zájmu se dnes rovněž dostává bližší studium epigenetických mechanismů, v čele s metylací promotorových oblastí jednotlivých genů vedoucí k umlčování transkripce a následně exprese proteinů příslušných genů.

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo stanovit hladiny metylací u 14 kandidátních genů účastnících se metabolismu 5-FU: *TK1*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *UCK2*, *UCK1*, *UMPS*, *TYMP*, *UPP1*, *UPP 2*, *SLC29A1*, *UPB1*, *DPYS* a *DPYD*. Předložená data ukazují, že z 15 analyzovaných genů pouze 3 vykazují vyšší hladiny metylace než 0%. Ve spolupráci s Doc. RNDr. Pavlem Součkem, PhD. ze SZÚ byla dále stanovena hladina exprese u vybraných genů *DPYS* a *UPB1*, *UPP2* a bylo zjištěno, že hypermetylace promotorových oblastí v genech zahrnutých do biotransformace 5-FU nepostihuje jejich úroveň exprese (Kunická et al. 2015)

Pro vlastní analýzu metylací jsem zvolila metodu MS-HRM. Ačkoliv pro detekci metylací se za zlatý standard stále považuje metoda pyrosekvenování, na základě studie, ve které byla porovnávána kvantifikace metylací mezi technikami MS-HRM a pyrosekvenací u 90 párových vzorků (nádor a zdravá tkáň) bylo prokázáno, že výsledky kvantifikace metylací technikou MS-HRM jsou naprosto srovnatelné s detekcí metylací metodou pyrosekvenování. Studie byla provedena u genů *APC* a *CDKN2A*, genů podílejících se na tumorogeneze (Migheli, Stocco et al. 2013). K výběru metody MS-HRM přispěl i fakt, že tato metoda je ve srovnání s pyrosekvenační technikou nejen jednodušší, ale především finančně i časově méně náročnou.

V naší studii jsme se zabývali analýzou důležitých genů zahrnutých v dráze 5-FU ve vztahu k prognóze pacientů s CRC léčených 5-FU. Studií zabývajících se vlivem metylace na úroveň genové exprese příslušných genů a její možný vliv na prognózu pacienta stále přibývá. Ačkoliv dosavadní studie nabízejí škálu výsledků, ne vždy se závěry shodují (Vasiljevic, Ahmad et al. 2014) (Kunická T. 2015)

Gen *DPYS* kóduje enzym dihydropyrimidinázu, zodpovědný za inaktivaci 5-FU (Thomas, Ezzeldin et al. 2007). V předložené diplomové práci jsme pozorovali hypermetylaci promotorové oblasti genu *DPYS* u pacientů s CRC v porovnání se zdravou tkání. Potvrdili jsme tak předešlé studie, které publikovaly rovněž hypermetylaci tohoto genu u pacientů s CRC, nádorem prsu a prostaty (Chung, Kwabi-Addo et al. 2008). Vasiljevic Ahnmad se spolupracovníky potvrdili, že rozdíly v metylaci genu *DPYS* (a *HSPB1*, *CCDN2*) úzce souvisí s prognózou pacientů s karcinomem prostaty (Vasiljevic, Ahmad et al. 2014). Zároveň jsme dokázali, že hypermetylace v promotorové oblasti tohoto genu úzce souvisí s horší prognózou CRC pacientů neléčených 5-FU (Log rank  $P=0,032$ ).

Gen *UPB1* je 5-FU inaktivující enzym účastnící se degradace pyrimidinových bází uracilu a thyminu (Thorn, Marsh et al. 2011). V naší studii jsme prokázali vliv hypermetylace genu *UPB1* na horší prognózu CRC pacientů neléčených 5-FU (Log Rank  $P=0,039$ ). Nicméně hladina metylace genu *UPB1* nekorelovala s hladinou mRNA či hladinou proteinů, což naznačuje, že prognózu pacientů komplexně ovlivňují další faktory. Dalším možným mechanismem, ovlivňující funkci genu *UPB1* je bezpochyby vliv miRNA interference. V nedávné studii byla publikovaná zajímavá spojitost mezi polymorfismem genu *UPB1* c.-80C>G (rs2070474) a zvýšenou gastrointestiniální toxicitou u pacientů léčených 5-FU (Fidlerova, Kleiblova et al. 2012).

Změny v DNA metylaci jsou důležité epigenetické změny, které můžou postihovat genovou expresi, aniž by při tom docházelo ke změnám v nukleotidové sekvenci DNA. Obecně platí, že přítomnost 5mC v promotorové oblasti je spojena s represí transkripce. (Basu and Zhang 2011). S metylací DNA se můžeme setkat i mimo promotorové oblasti, častěji v exonech než intronech. Hypomethylace DNA promotorové oblasti genu může naopak genovou expresi aktivovat. Proto je proces metylace a demethylace velmi důležitým mechanismem pro správné fungování organismu. Nevyváženost v tomto mechanismu nalézáme u patologických stavů (Lister, Pelizzola et al. 2009). Methylace jako epigenetický mechanismus hraje významnou roli v rozvoji řady nádorů. Farkas a spolupracovníci v roce 2014 celogenomovou analýzou metylací prokázali vliv hypermetylace na sníženou expresi genů *EDNRB1*, *GPC6* a *SMAD2*. Rovněž prokázali vliv hypomethylací na zvýšenou mRNA expresi genů *CASP8* a *DCLRE1C* u pacientů s CRC. Tyto geny jsou rovněž u pacientů s CRC mutovány (Farkas, Vymetalkova et al. 2014). Vymetalková a spolupracovníci v roce 2014 ve své studii pozorovali hladinu exprese

genů zahrnutých do mismatch oprav (MMR) u 53 pacientů s CRC. Autoři pozorovali významné zvýšení hladin transkripce u genu *OXO1* v tumorové tkáni ( $P=0,05$ ) a významně zvýšenou hladinu exprese genu *MSH3* v tumorové tkáni tlustého střeva v porovnání s nenádorovou tkání. Zajímavé bylo, že všechny geny MMR byly rozdílně exprimovány v závislosti na lokalizaci nádoru. Zejména nádor tlustého střeva ukázal zvýšenou regulaci genu *EXO1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* a *PMS2* v porovnání s nádorem konečníku ( $p=0,02$ ). Metylace promotorových oblastí genu *MLH1* byla však pozorována pouze u 9% pacientů. Tento výstup by mohl potvrdit, že na hladinu exprese mohou mít vliv i ostatní mechanismy, zahrnující miRNA, mutace či jednonukleotidové polymorfismy (SNPs), ale k vzhledem k malému souboru pacientů a sledování hladin metylací pouze u genu *MLH1* nelze vztah mezi metylací v MMR genech a jejich odpovídající expresí významně potvrdit (Vymetalkova, Slysokova et al. 2014).

DNA metylace je jeden ze systémů buňky, jak regulovat genovou expresi. Některé geny však tento epigenetický mechanismus nemusí využívat, proto se u řady námi studovaných genů vyskytovala nulová metylace. Exprese genů může být regulována jinými mechanismy, např. zmíněnými mutacemi, miRNA či SNPs. Stejným principem můžeme zodpovědět otázku, proč se metylace naopak u některých genů vyskytovala i v tkáni nenádorové? Metylace má regulovat expresi konkrétního genu. Někdy je pro buňku nežádoucí, aby se například gen přepisoval z obou alel (například X-chromozom) a zásluhou metylace je tedy jeden z nich inaktivovaný (Basu and Zhang 2011).

Studií zabývajících se metylacemi promotorových oblastí genů ve vztahu k rozvoji nádorového onemocnění byla publikovaná celá řada. V naší studii jsme se však snažili zaměřit na kandidátní geny spjaté s 5-FU a případnou léčbu či prognózu pacientů s nádory. V tomto odvětví výzkumu zatím nedospěli k mnoha výstupům. Sledování vlivu epigenetických mechanismů na možnosti léčby a predikování prognózy zasluhuje mnohem zevrubnější zkoumání a nabízí celou škálu možností pro další studie.

## 7 Závěr

V mé diplomové práci jsme stanovili hladiny metylací u všech 14 kandidátních genů účastnících se biotransformace 5-FU. U 11 genů *TK1*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *UCK2*, *UCK1*, *UMPS*, *TYMP*, *UPP1*, *SLC29A1*, *DPYD* nebyla nalezena hladina metylací vyšší než 0%. U genu *UPP2* byla nalezena hladina metylací vyšších hodnot, avšak mezi nádorem a nenádorovou tkání nebyl potvrzen signifikantní rozdíl. U genu *DPYS* byly rovněž nalezeny vyšší hladiny metylací. Významné rozdíly v hladinách metylací mezi nádorovou a nenádorovou tkání se vyskytovaly v testovacím souboru pacientů a ve validačním souboru I. Validačním soubor II. signifikantní rozdíly mezi tkáněmi nevykazoval. U genu *UPB1*, s hladinami metylací nejvyšších hodnot, byl pozorován statisticky významný rozdíl v hladinách metylací mezi nádorovou a nenádorovou tkání pouze u testovacího souboru pacientů, avšak u validačního souboru I. a validačního souboru II. nebyly významné rozdíly potvrzeny.

Závěrem lze také říct, že se nám podařilo navrhnout všech 14 párů primerů pro jednotlivé promotorové oblasti kandidátních genů a spolu s nimi zoptimalizovat MS-HRM pro co nejcitlivější rozlišení standardů se známou úrovní metylace, díky čemuž jsme posléze dosáhli co nejpřesnější porovnání standardů se vzorky pro určení neznámých hladin metylací všech vzorků.

Naše závěry ohledně asociací hladiny metylací genu *DPYS* byly potvrzeny i pomocí celogenomových metylačních analýz. Tyhle výsledky byli statisticky významné a poukazují na důležitou roli aberantních metylací v CRC etiologii.

Na základě klinickopatologických dat pacientů u validačního souboru I. validačního souboru II. byly pomocí Kaplan-Meierovy analýzy porovnávány stanovené parametry genů *DPYS*, *UPB1* a *UUP2* ve vztahu k terapii 5-FU. Nalezli jsme, že hypermetylace genu *DPYS* a *UPB1* mají vliv na prognózu pacientů. CRC pacienti léčení 5-FU vykazovali lepší prognózu než pacienti léčení jinými chemoterapeutiky.

## 8 Použitá literatura

Akiyama, S., T. Furukawa, T. Sumizawa, Y. Takebayashi, Y. Nakajima, S. Shimaoka and M. Haraguchi (2004). "The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumor progression." Cancer Sci **95**(11): 851-857.

Baldwin, S. A., J. R. Mackey, C. E. Cass and J. D. Young (1999). "Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development." Mol Med Today **5**(5): 216-224.

Bardeesy, N. and R. A. DePinho (2002). "Pancreatic cancer biology and genetics." Nat Rev Cancer **2**(12): 897-909.

Basu, R. and L. F. Zhang (2011). "X chromosome inactivation: a silence that needs to be broken." Genesis **49**(11): 821-834.

Berger, S. L., T. Kouzarides, R. Shiekhata and A. Shilatifard (2009). "An operational definition of epigenetics." Genes Dev **23**(7): 781-783.

Blanke, C. D., M. Teng and H. Choy (1999). "The role of UFT in combined-modality therapy." Oncology (Williston Park) **13**(10 Suppl 5): 47-54.

Boige, V., J. Mendiboure, J. P. Pignon, M. A. Loriot, M. Castaing, M. Barrois, D. Malka, D. A. Tregouet, O. Bouche, D. Le Corre, I. Miran, C. Mulot, M. Ducreux, P. Beaune and P. Laurent-Puig (2010). "Pharmacogenetic Assessment of Toxicity and Outcome in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05." Journal of Clinical Oncology **28**(15): 2556-2564.

Campa, D., C. Rizzato, G. Capurso, N. Giese, N. Funel et al (2013). "Genetic susceptibility to pancreatic cancer and its functional characterisation: the PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium." Dig Liver Dis **45**(2): 95-99.

Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**(4): 642-655.

Cibula, D.-a kolektiv Praha (2009). " Onkogynekologie." Grada Publishing.



de Gramont, A., A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi, J. Cassidy, C. Boni, H. Cortes-Funes, A. Cervantes, G. Freyer, D. Papamichael, N. Le Bail, C. Louvet, D. Hendler, F. de Braud, C. Wilson, F. Morvan and A. Bonetti (2000). "Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer." Journal of Clinical Oncology **18**(16): 2938-2947.

Douillard, J. Y., D. Cunningham, A. D. Roth, M. Navarro, R. D. James, P. Karasek, P. Jandik, T. Iveson, J. Carmichael, M. Alakl, G. Gruia, L. Awad and P. Rougier (2000). "Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial." Lancet **355**(9209): 1041-1047.

Er, T. K. and J. G. Chang (2012). "High-resolution melting: applications in genetic disorders." Clin Chim Acta **414**: 197-201.

Farkas, S. A., V. Vymetalkova, L. Vodickova, P. Vodicka and T. K. Nilsson (2014). "DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/beta-catenin signaling pathway genes." Epigenomics **6**(2): 179-191.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.

Fidlerova, J., P. Kleiblova, S. Kormunda, J. Novotny and Z. Kleibl (2012). "Contribution of the beta-ureidopropionase (UPB1) gene alterations to the development of fluoropyrimidine-related toxicity." Pharmacol Rep **64**(5): 1234-1242.

Fletcher, T. M. and J. C. Hansen (1996). "The nucleosomal array: structure/function relationships." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **6**(2-3): 149-188.

Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy and C. L. Paul (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1827-1831.

- Giacchetti, S., B. Perpoint, R. Zidani, N. Le Bail, R. Faggiuolo, C. Focan, P. Chollet, J. F. Llory, Y. Letourneau, B. Coudert, F. Bertheaut-Cvitkovic, D. Larregain-Fournier, A. Le Rol, S. Walter, R. Adam, J. L. Misset and F. Levi (2000). "Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **18**(1): 136-147.
- Gibney, E. R. and C. M. Nolan (2010). "Epigenetics and gene expression." Heredity (Edinb) **105**(1): 4-13.
- Goldberg, A. D., C. D. Allis and E. Bernstein (2007). "Epigenetics: a landscape takes shape." Cell **128**(4): 635-638.
- Gomez-Diaz, E., M. Jorda, M. A. Peinado and A. Rivero (2012). "Epigenetics of host-pathogen interactions: the road ahead and the road behind." PLoS Pathog **8**(11): e1003007.
- Grady, W. M. and C. C. Pritchard (2014). "Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer." Toxicol Pathol **42**(1): 124-139.
- Gundry, C. N., S. F. Dobrowolski, Y. R. Martin, T. C. Robbins, L. M. Nay, N. Boyd, T. Coyne, M. D. Wall, C. T. Wittwer and D. H. Teng (2008). "Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons." Nucleic Acids Res **36**(10): 3401-3408.
- Hayatsu, H., Y. Wataya and K. Kazushige (1970). "The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine." J Am Chem Soc **92**(3): 724-726.
- Hebbes, T. R., A. W. Thorne and C. Crane-Robinson (1988). "A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin." EMBO J **7**(5): 1395-1402.
- Heggie, G. D., J. P. Sommadossi, D. S. Cross, W. J. Huster and R. B. Diasio (1987). "Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile." Cancer Res **47**(8): 2203-2206.
- Heidelberger, C., N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin and J. Scheiner (1957). "Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds." Nature **179**(4561): 663-666.

- Hermann, A., H. Gowher and A. Jeltsch (2004). "Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases." Cell Mol Life Sci **61**(19-20): 2571-2587.
- Hong, L., G. P. Schroth, H. R. Matthews, P. Yau and E. M. Bradbury (1993). "Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA." J Biol Chem **268**(1): 305-314.
- Hong, S. M., J. Y. Park, R. H. Hruban and M. Goggins (2011). "Molecular Signatures of Pancreatic Cancer." Archives of Pathology & Laboratory Medicine **135**(6): 716-727.
- Cho, K. R. and I. M. Shih (2009). "Ovarian Cancer." Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease **4**: 287-313.
- Chung, W., B. Kwabi-Addo, M. Ittmann, J. Jelinek, L. Shen, Y. Yu and J. P. Issa (2008). "Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling." PLoS One **3**(4): e2079.
- Imai, K. and H. Yamamoto (2008). "Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics." Carcinogenesis **29**(4): 673-680.
- Inbar-Feigenberg, M., S. Choufani, D. T. Butcher, M. Roifman and R. Weksberg (2013). "Basic concepts of epigenetics." Fertility and Sterility **99**(3): 607-615.
- Inbar-Feigenberg, M., S. Choufani, D. T. Butcher, M. Roifman and R. Weksberg (2013). "Basic concepts of epigenetics." Fertil Steril **99**(3): 607-615.
- Johnston, P. G. and S. Kaye (2001). "Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors." Anticancer Drugs **12**(8): 639-646.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-428.
- Joseph Panno, P. (2005). "Cancer, The role of Genes, Lifestyle and environment " The new biology: 1-170.
- Jurkowska, R. Z., T. P. Jurkowski and A. Jeltsch (2011). "Structure and function of mammalian DNA methyltransferases." Chembiochem **12**(2): 206-222.

Kakar, S., L. J. Burgart, S. N. Thibodeau, K. G. Rabe, G. M. Petersen, R. M. Goldberg and N. M. Lindor (2003). "Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age." Cancer **97**(6): 1421-1427.

Karlan Beth, Y. (2009). "Patients at High Risk for Ovarian Cancer Should Undergo Routine Screening." Clinical Ovarian Cancer **2**: 83-89.

Kašička V 1997. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod Chem. Listy 91: 320-329.

Kern, E. S. C. a. S. E. (2008). "Molecular Genetics of Pancreatic Cancer." Springer Science+Business Media: 27-39.

Klocová K., S. M., Vyzula R. (5/2003). "Dihydropyrimidin dehydrogenáza a její role v prediktivní onkologii." Klinická onkologie.

Kunicka T., P. P., Krus I., Bendova P., Protivova M., Susova S., Hlavac V., Liska V., Novak P., Schneiderova M., Pitule P., Bruha J., Vycital O., Vodicka P., Soucek P. (2015). "Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma."

Labianca, R., S. Marsoni, G. Pancera, V. Torri, A. Zaniboni, C. Erlichman, J. Pater, L. Shepherd, B. et al. (1995). "Efficacy of Adjuvant Fluorouracil and Folinic Acid in Colon-Cancer." Lancet **345**(8955): 939-944.

Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.

Li, D. H., K. P. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). "Pancreatic cancer." Lancet **363**(9414): 1049-1057.

Li, E., T. H. Bestor and R. Jaenisch (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." Cell **69**(6): 915-926.

Ling, S., T. Feng, K. Jia, Y. Tian and Y. Li (2013) "Inflammation to cancer: The molecular biology in the pancreas (Review)." Oncol Lett **7**(6): 1747-1754.

Lipská, L., Visokai Vladimír a kolektiv (Grada Publishing 2009). "Recidiva kolorektálního karcinomu." 1-427.

Lister, R., M. Pelizzola, R. H. Dowen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q. M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren and J. R. Ecker (2009). "Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences." Nature 462(7271): 315-322.

Longley, D. B., D. P. Harkin and P. G. Johnston (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." Nat Rev Cancer 3(5): 330-338.

Malet-Martino, M. and R. Martino (2002). "Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review." Oncologist 7(4): 288-323.

Manuál CorPotocol 6000, High Resolution Melt Assay Design and Analysis. Corbett, 2006.

Martínková J., H. M., Grim J. (2011). "Poznámky k inovacím v cytostatické terapii 5-fluorouracilem." Klinická farmakologie a farmacie: 87-91.

Migheli, F., A. Stoccoro, F. Coppede, W. A. Wan Omar, A. Failli, R. Consolini, M. Seccia, R. Spisni, P. Miccoli, J. C. Mathers and L. Migliore (2013). "Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation." PLoS One 8(1): e52501.

Moir, J. A., J. Mann and S. A. White (2015) "The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer." Surg Oncol.

Moss, T., R. M. Stephens, C. Crane-Robinson and E. M. Bradbury (1977). "A nucleosome-like structure containing DNA and the arginine-rich histones H3 and H4." Nucleic Acids Res 4(7): 2477-2485.

Norambuena, P. A., J. A. Copeland, P. Krenkova, A. Stamberгова and M. Macek, Jr. (2009). "Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene." Clin Biochem 42(12): 1308-1316.

Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-257.

Pardini, B., R. Kumar, A. Naccarati, J. Novotny, R. B. Prasad, A. Forsti, K. Hemminki, P. Vodicka and J. Lorenzo Bermejo "5-Fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes." Br J Clin Pharmacol **72**(1): 162-163.

Pardini, B., R. Kumar, A. Naccarati, J. Novotny, R. B. Prasad, A. Forsti, K. Hemminki, P. Vodicka and J. Lorenzo Bermejo (2011). "5-Fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes." Br J Clin Pharmacol **72**(1): 162-163.

Pawlak, M. and R. Jaenisch (2011). "De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state." Genes Dev **25**(10): 1035-1040.

Perumal, M., R. G. Pillai, H. Barthel, J. Leyton, J. R. Latigo, M. Forster, F. Mitchell, A. L. Jackman and E. O. Aboagye (2006). "Redistribution of nucleoside transporters to the cell membrane provides a novel approach for imaging thymidylate synthase inhibition by positron emission tomography." Cancer Res **66**(17): 8558-8564.

Pradhan, S., A. Bacolla, R. D. Wells and R. J. Roberts (1999). "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation." J Biol Chem **274**(46): 33002-33010.

Reed, G. H., J. O. Kent and C. T. Wittwer (2007). "High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics." Pharmacogenomics **8**(6): 597-608.

Ruffner, H. and I. M. Verma (1997). "BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(14): 7138-7143.

Saif, M. W., A. Choma, S. J. Salamone and E. Chu (2009). "Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes." J Natl Cancer Inst **101**(22): 1543-1552.

- Shapiro, Robert., Robert E. Servis a Marvin. Welcher. Reactions of Uracil and Cytosine Derivatives with Sodium Bisulfite. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1970, 92(2): 422-424 [cit. 2015-08-12]. DOI: 10.1021/ja00705a626.
- Sharma, S., T. K. Kelly and P. A. Jones (2010). "Epigenetics in cancer." *Carcinogenesis* **31**(1): 27-36.
- Shirasaka, T. (2009). "Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1): its clinical usefulness and future vistas." *Jpn J Clin Oncol* **39**(1): 2-15.
- Simmons, D. P. S. a. M. J. (2009). "Genetika." 894.
- Smit, V. T. H. B. M., A. J. M. Boot, A. M. M. Smits, G. J. Fleuren, C. J. Cornelisse and J. L. Bos (1988). "Kras Codon-12 Mutations Occur Very Frequently in Pancreatic Adenocarcinomas." *Nucleic Acids Research* **16**(16): 7773-7782.
- Snustad, D a Michael J Simmons. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2
- Suzuki, M. M. and A. Bird (2008). "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics." *Nat Rev Genet* **9**(6): 465-476.
- Svoboda M., S. O. (2004). "Individualizace farmakoterapie inhibitory tymidylát syntázy u nádorů gastrointestinálního traktu." *Klin Farmakol Farm*: 149-152.
- Takayama, T., K. Miyanishi, T. Hayashi, Y. Sato and Y. Niitsu (2006). "Colorectal cancer: genetics of development and metastasis." *J Gastroenterol* **41**(3): 185-192.
- Thomas, H. R., H. H. Ezzeldin, V. Guarcello, L. K. Mattison, B. L. Fridley and R. B. Diasio (2007). "Genetic regulation of dihydropyrimidinase and its possible implication in altered uracil catabolism." *Pharmacogenet Genomics* **17**(11): 973-987.
- Thorn, C. F., S. Marsh, M. W. Carrillo, H. L. McLeod, T. E. Klein and R. B. Altman (2011). "PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways." *Pharmacogenet Genomics* **21**(4): 237-242.
- Tibbetts, A. S. and D. R. Appling (2010). "Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism." *Annu Rev Nutr* **30**: 57-81.

- Ulrich, C. M., K. Robien and H. L. McLeod (2003). "Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond." Nat Rev Cancer **3**(12): 912-920.
- Vasiljevic, N., A. S. Ahmad, M. A. Thorat, G. Fisher, D. M. Berney, H. Moller, C. S. Foster, J. Cuzick and A. T. Lorincz (2014). "DNA methylation gene-based models indicating independent poor outcome in prostate cancer." BMC Cancer **14**: 655.
- von Kanel, T. and A. R. Huber (2013). "DNA methylation analysis." Swiss Med Wkly **143**: w13799.
- Vymetalkova, V., P. Soucek, T. Kunicka, K. Jiraskova, V. Brynychova, B. Pardini, V. Novosadova, Z. Polivkova, K. Kubackova, R. Kozevnikovova, M. Ambrus, L. Vodickova, A. Naccarati and P. Vodicka (2015). "Genotype and Haplotype Analyses of TP53 Gene in Breast Cancer Patients: Association with Risk and Clinical Outcomes." PLoS One **10**(7): e0134463.
- Vymetalkova, V. P., J. Slysokova, V. Korenkova, L. Bielik, L. Langerova, P. Prochazka, A. Rejhova, L. Schwarzova, B. Pardini, A. Naccarati and P. Vodicka (2014). "Molecular characteristics of mismatch repair genes in sporadic colorectal tumors in Czech patients." BMC Med Genet **15**: 17.
- White, H., G. L. Potts & N. C. P. Cross (2006) NGRL (Wessex) evaluation of high resolution melt curve analysis for mutation scanning. *Journal of Medical Genetics*, **43**, S85-S85.
- Wilson, P. M., P. V. Danenberg, P. G. Johnston, H. J. Lenz and R. D. Ladner (2014). "Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy." Nat Rev Clin Oncol **11**(5): 282-298.
- Wojdacz, T. K., A. Dobrovic and L. L. Hansen (2008). "Methylation-sensitive high-resolution melting." Nat Protoc **3**(12): 1903-1908.
- Worthley, D. L., V. L. Whitehall, K. J. Spring and B. A. Leggett (2007). "Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer." World J Gastroenterol **13**(28): 3784-3791.
- Wyatt, M. D. and D. M. Wilson, 3rd (2009). "Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil." Cell Mol Life Sci **66**(5): 788-799.



Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp and D. P. Bartel (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell 101(1): 25-33.

Zdeněk Adam, M. K., Jiří Vorlíček et al (2010). "Speciální onkologie." 183-196.

Zdeněk Krška, D. H., David Ptruželka a kol. (2014). "Chirurgická onkologie." Grada Publishing: 1-904.